

Aus der Augenklinik der Universität
Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. E. SCHRECK

**VOM EINFLUSS DES ACECLIDINS AUF DEN SAUER-
STOFFVERBRAUCH VON ÜBERLEBENDEM
LINSENEPITHEL UND IRISGEWEBE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Walter MUNKERT
aus Nürnberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Augenklinik der Universität
Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. E. SCHRECK

VOM EINFLUSS DES ACECLIDINS AUF DEN SAUERSTOFFVERBRAUCH
VON ÜBERLEBENDEM LINSENEPITHEL UND IRISGEWEBE.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Walter MUNKERT
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Priv.-Doz. Dr. U. Mayer

Korreferent: Prof. Dr. E. Schreck

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.1980

INHALTSVERZEICHNIS

=====

Seite

A. <u>EINFÜHRUNG</u>	1
I. Einleitung	1
II. Wirkungsweise von Miotica, im besonde- ren Aceclidin	1
1. Anwendungsbereich	1
2. Chemie und Pharmakologie einschl. Toxikologie	2
3. Funktion und Applikationsweise	3
4. Fragestellung	8
B. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	9
I. Gewebekultur und ihre Möglichkeiten	9
1. Morphologie der Zellkulturen	9
a) Linsengewebe im Verband und in der Kultur	9
b) Irisgewebe im Verband und in der Kultur	15
2. Stoffwechselphysiologie der Zell- kulturen	19
a) Irisgewebe	19
b) Linsengewebe	19
II. Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes	21
1. Präparationshinweise	21
2. Nährmedium	21
3. Mikrospirometerapparatur nach WARBURG	22
a) Anwendung	22
b) Aufbau	24
c) PARDEE-"Puffer"	25

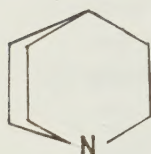
4. Biomikroskopie	26
5. Statistische Methoden und Auswertung	26
C. <u>ERGEBNISSE</u>	28
I. Konzentration von Aceclidin in der Kultur	28
II. O ₂ -Verbrauch von Linsenepithel und Irisgewebe mit und ohne Glaukostat ^R	32
1. Linsengewebe	32
2. Irisgewebe	36
III. Vergleich mit anderen Substanzen	41
D. <u>AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE</u>	42
I. Vergleich der Atmungsaktivität von Linsenepithel und Irisgewebe	42
II. Vergleich der Befunde mit der Enzymausstattung der Gewebe	42
III. Physiologische Vielseitigkeit des Stoffwechsels von Linsenepithel und Irisgewebe	43
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG</u>	44
F. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	I - X

A I. EINLEITUNG

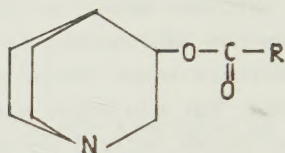
Schon in Goethes Faust wird vom Drang des Menschen, ein von ihm gezüchtetes, lebendes Wesen in vitro zu erschaffen, berichtet. In unserem Jahrhundert gelang es den Forschern, Zellen außerhalb ihrer gewohnten Umgebung zum Wachstum zu bringen. Für ein Organ wie die Linse des Auges, welches nur durch Perfusion ernährt wird, scheint dieser Versuch interessant. Hier läßt sich beobachten, wie das Epithel der Linse während des Lebens konstant die Funktion des durchsichtigen Organs aufrecht erhält und wie die Zellen zudem einer dauernden Umwandlung in optisch wirksame Fasern unterliegen. Diese Gegebenheiten ausnützend, stellte sich dem Verfasser die Aufgabe, Strukturen des Auges wie Linsenepithelien und Irisgewebe in der Kultur unter dem Einfluß körperfremder Stoffe zu studieren. Hierbei war zu untersuchen, inwiefern direkte Parasympathomimetika, in unserem Falle 3-Azetoxym-Chinuclidin-Aceclidin, die Atmung der oben genannten Gewebe in der Kultur beeinflussen.

II. ACECLIDIN

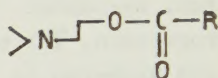
Das heterozyklische System von Chinuclidin- $[1\text{-azabizyklo-}(2,2,2)\text{-octan}]$ ist struktureller Teil einer Vielzahl natürlicher und synthetischer physiologisch wirksamer Substanzen. Die 3-Hydroxychinuclidin-ester (I b) können als bizyklische Analoge der 2-Dialkylaminoäthanol-ester (II) betrachtet werden. Es hat sich gezeigt, daß viele Verbindungen der Struktur (II) (Adiphenin, Benactizin usw.) anticholinerge sowie andere neurotrope Eigenschaften besitzen. Die Alkaloid-Moleküle, die zur Gruppe der Cinchonin-cinchonaminen, Rauwolfia-Alkaloide, Serpagin-Ajmalin zählen, enthalten das Chinuclidin-Ringsystem (I a).



Ia



Ib



II

Quarternäre Derivate derartiger Ester können anticholinerge, ganglion- und neuromuskulärblockierende Eigenschaften ebenso gut wie cholinergische Aktivität aufweisen. Acetylcholin ist ein quarternärer Abkömmling dieser Reihe.

Chemische Eigenschaften

Das Chinuclidinmolekül besteht aus einem gesättigten, bityklischen System mit einem Stickstoffatom in Brückenbindung. Im Gegensatz zu tertiären aliphatischen Aminen und N-substituierten Piperidinen weist Chinuclidin eine rigide Struktur auf. Die Atome, welche sein Kerngerüst bilden, sind nicht in der Lage, ihre Positionen durch Rotation im bityklischen System zu wechseln. Im Vergleich mit anderen 1-Azabicyklo-Alkanen kennzeichnet das Chinuclidinmolekül Symmetrie und Stabilität.

Unsubstituiertes Chinuclidin bildet eine flüchtige kristalline Substanz mit hohem Schmelzpunkt (158°C). Es sublimiert leicht beim Offenstehenlassen.

Für monozyklische Moleküle ließen sich charakteristische Absorptionsbanden finden ($2700 - 2800 \text{ cm}^{-1}$), die von der

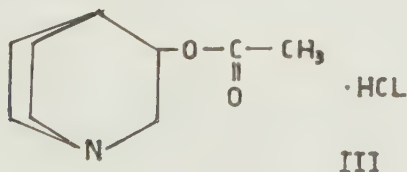
Interaktion zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms und den benachbarten axialen C-H-Banden herühren. Chinuclidin absorbiert in diesem Bereich nicht, aller Wahrscheinlichkeit nach wegen des Fehlens solcher Interaktionen. Charakteristische Absorptionsbanden des Chinuclidins liegen bei 2430, 2915, 3405 cm^{-1} .

Die Basizität des Moleküls, die von der Elektronendichte des Stickstoffatoms abhängt, ist verhältnismäßig hoch (pK_a 10,58) und liegt nahe derjenigen der aliphatischen Amine.

Wie andere tertiäre aliphatische Amine bildet Chinuclidin mit Mineral- und organischen Säuren leicht Salze. Die Besonderheiten der Struktur Chinuclidins sind der Grund für seine chemische Stabilität. Chinuclidin lässt sich nicht durch Erhitzen mit Mineralsäuren oder durch Behandeln mit KMNO_4 verändern.

Pharmakologie

Das 3-Acetoxychinuclidinol-Aceclidin- (III) weist folgende Strukturformel auf:



Das Molekulargewicht beträgt 205,5.

Durch Zufügen einer Methyl- oder Phenylgruppe an Position 3 des Chinuclidinringes resultiert ein starker Verlust cholinergischer Aktivität. Eine Vergrößerung des Abstandes zwischen der Acylgruppe und des Chinuclidinringes sowie Vergrößerung der aliphatischen Seitenkette und Zufügen einer Alkyl- oder Arylgruppe in Position 3 des Chinuclidinringes

führen ebenfalls zu Verringerung oder Verlust cholinergischer Aktivität oder zum Auftreten anticholinergischer Eigenschaften. Eine 2 %-ige Lösung des Hydrochlorids entspricht einer 0,097-molaren Lösung. Ophthalmologische Anwendung findet es in dieser Konzentration. Aceclidin wird in lyophilisierter Form gehandelt. Bei Gebrauch versetzt man es mit einem Lösungsmittel und einem Puffer. In Pulverform verliert Aceclidin nur etwa 5 % an Aktivität innerhalb von 3 Monaten bei 37°C. In Lösung entsteht ein ähnlicher Aktivitätsverlust nach ca. 30 Tagen bei 22°C (TARRERIAS und VASSALO, 1967). Der pH des Hydrochlorids (Pulverform) beträgt 6,6. Im Laufe der Zeit nimmt der pH etwa auf 6,43 beim Aceclidinhydrochlorid ab.

Allgemeine cholinergische Eigenschaften von 3-Acetoxychinuclidin:

Aceclidin übt eine inhibierende Wirkung auf Pseudo- und Acetylcholinesterasen aus.

Beim Kaninchen bewirkt die i.v.-Injektion von Aceclidin in steigenden Dosen Veränderungen der Blutdruckkurve. Die Stärke und Dauer der hypotonen Phasen ist proportional zur Dosis. Die Amplitude und Frequenz der Atmung verändern sich, besonders wenn hohe Dosen verabreicht werden.

Wirkung auf isolierte Organe:

Im Tierversuch bedingt Aceclidin einen Anstieg des intestinalen Muskeltonus und der Darmmotilität bei einer Dosis von 0,05-0,1-0,5 mg/kg. Die gleiche Dosis verursacht Uteruskontraktionen, Blasen- sowie Bronchienkonstriktion.

Aceclidin ruft keine Lokalanästhesie hervor. Subcutan an Ratten in einer Dosis von 25 - 50 mg/kg verabreicht, löst Aceclidin intensiven Speichel- und Tränenfluß sowie Diarrhoe aus. Toxische Dosen rufen Zittern und Konvulsionen hervor.

Im Duodenum wirkt Aceclidin 25 mal stärker als Pilocarpin. Ganglienblockierende Substanzen schwächen oder heben nicht die Wirkungen von 3-Acetoxychinuclidin-HCL auf. Am isolierten Duodenum der Ratte wurde festgestellt, daß die cholin-

gische Wirkung von Aceclidin durch Atropinsulfat antagonistisch aufgehoben oder vermindert werden kann. Papaverin verringert an isolierten Organen (Darm, Uterus) ebenso die Wirksamkeit Aceclidins.

Im Gegensatz zu Acetylcholin wird Aceclidin durch Cholinesterasen nicht oder nur geringfügig abgebaut.

Wirkungen am zentralen Nervensystem:

Hier besitzt Aceclidin ebenfalls cholinergische Aktivität; im EEG (Tierexperiment) ruft es typische Erregungszeichen hervor.

In 2 - 4 %-iger Konzentration wird Aceclidin als Augentropfen gut vertragen (YANKLOWITZ 1965). Das Medikament dringt rasch in die Vorderkammer ein (ROUHER, 1966).

Die Derivate des 3-Chinuclidinols und besonders des 3-Acetoxychinuclidinols zeichnen sich durch einen miotischen und augeninnendrucksenkenden Effekt aus. Die letztgenannte Verbindung zeigt eine starke Muskarin-Aktivität und fast vollständiges Fehlen von Nicotin-Eigenschaften. Ein derartiges Verhalten dürfte sich durch den unterschiedlichen Bau der Muskarin- und Nicotin-Rezeptoren erklären lassen, sowie auch durch die räumliche Anordnung des Moleküls. Tatsächlich soll im 3-Acetoxychinuclidinol die Interatomdistanz N-O nahe derjenigen sein, die man im für den Muskarin-Rezeptor günstigen Acetylcholinabbau beobachtet.

Wirkungen am Auge:

ETIENNE hat festgestellt, daß Aceclidin den Kammerwasserabfluß verbessert, im Vergleich mit Pilocarpin hier jedoch schwächer wirkt (DEMAILLY).

Aceclidin senkt den intraocularen Druck bei gesunden sowie glaukomekrankten Personen. DEMAILLY erklärt den Druckabfall bei Aceclidin-Applikation durch den geringeren Anstieg reaktiver Hypersekretion, der auch Pilocarpin zu eigen ist. Nach LIEBERMANN und IRVING kann die intraoculare Drucksenkung durch Aceclidin ohne Anstieg des Kammerwasserabflusses durch eine Verminderung der Kammerwasserproduktion erklärt werden. Pathophysiologisch handelt es sich

beim Glaukom um eine Störung in der Regulation der Tensio intraocularis. Ursache hierfür ist eine Abflußstörung oder Überproduktion des Kammerwassers. Durch eine Verengung des Winkels der vorderen Augenkammer findet sich der Zustrom zum SCHLEMM'schen Trabekelwerk eingeengt (Engwinkel- bis Winkelblockglaukom). Produktion und Abfluß von Kammerwasser müssen gut aufeinander abgestimmt sein, da jede Änderung dieser Parameter eine Drucksteigerung bzw. einen Druckabfall hervorruft. Weiterhin liegt beim Glaukomaugue eine allgemeine Drucksteigerung vor, sobald eine Abflußbehinderung des Kammerwassers durch die im Alter zunehmende Verfilzung des Trabekelwerkes (Hyalinisierung nach ROHEN) einsetzt. Die Konstanz des Druckniveaus geht wiederum verloren: es treten höhere Druckschwankungen auf, die offenbar auf einer Insuffizienz der gegenregulatorischen Kräfte beruhen. Parasympathomimetika bzw. Stoffe mit parasympathomimetischen Eigenschaften (muskarinähnliche Wirkung des Aceclidins) sind besonders wirkungsvoll, wenn der Kammerwasserabfluß bei engem Kammerwinkel behindert ist. Durch Erregung des M. sphincter pupillae und des M. ciliaris wird der Kammerwinkel entfaltet und der Abfluß erleichtert. Ebenso wird vermutet, daß Parasympathomimetika die Bildung von Kammerwasser hemmen.

Nach klinischen und experimentellen Versuchen beschreiben zahlreiche Autoren (LIEBERMANN und LEOPOLD, ROMANO, ETIENNE, DEMAÏLLY, LEYDHECKER) den drucksenkenden Effekt des Aceclidins (Glaukostat^R) als dem des Pilocarpins ebenbürtig (ROMANO 1970) bzw. leicht überlegen (BASTIDE, TRONCHE, ROUHER). Die Senkung des intraocularen Druckes wird deutlich bei Anwendung von 0,5, 1, 2, 4 %-igen Aceclidinkonzentrationen. Die Drucksenkung beginnt nach ca. 1 Stunde und erreicht ihr Maximum nach 2 Stunden nach Instillation. Alle genannten Konzentrationen waren noch nach 7 Stunden wirksam (RIEGEL, LEYDHECKER).

Weitere Untersuchungen zeigten, daß Aceclidin eine transitorische Myopie hervorruft, die jedoch im Vergleich mit Pilocarpin geringer ausfällt (MEYTHALER et al.). Auf der anderen Seite bewirkt Glaukostat^R eine etwas stärkere Miosis.

Begleiterscheinungen:

Nach 3 - 7 Tagen Anwendung von Glaukostat^R können folgende Beobachtungen getroffen werden: leichte Hyperämie der Bindehaut, der Lidränder, mangelnde Sekretion des Tränenflusses, Pupillenreflex auf Licht durch Miosis aufgehoben, fehlende Dunkeladaptation durch Pupillenerweiterung, selten Rhinorrhoe oder gastrointestinale Störungen. Bei chronischer Applikation am Auge konnte keine durch Fluorescein nachweisbare Hornhautläsion nachgewiesen werden. Bei Pilocarpinallergie nimmt Aceclidin bei der Behandlung des Offenwinkelglaukoms dessen Stellung ein (LIEBERMANN, IRVING). Es findet nach MEYTHALER et al. zudem bei Patienten bis zum 50. Lebensjahr bevorzugt Anwendung, da die transitorische Myopisierung wesentlich geringer ausfällt als bei anderen Miotica.

Toxizität:

Die Versuche zur Bestimmung der Toxizität nach verschiedenen Applikationsarten lassen den Schluß zu, daß diese bei 3-Azetoxychinuclidin-HCL etwa in derselben Größenordnung vorliegt, wie sie auch bei anderen starken Parasympathomimetika (z.B. Pilocarpin) festzustellen ist.

Die nach der BEHRENS und KÄRBER-Methode gefundenen LD₅₀-Werte sind:

LD ₅₀	i.v.	Maus	=	0,027 g/kg
LD ₅₀	i.p.	Maus	=	0,116 g/kg
LD ₅₀	i.p.	Ratte	=	0,105 g/kg.

Die Tachyphylaxie nach wiederholten Gaben von Aceclidin erwies sich als mindestens so gering wie bei Pilocarpin (YANKLOWITZ 1965).

Aufgrund seiner Wirksamkeit, den intraocularen Druck zu senken, sowie der ausreichenden Verträglichkeit hat Aceclidin Einzug in die Behandlung des Glaukoms gefunden.

Einfluß des Aceclidins auf den Stoffwechsel von Iris- und Linsengewebe:

Es liegt nahe, Alterationen des Stoffwechsels kultivierter Gewebe unter dem Einfluß verschiedenartiger Substanzen zu untersuchen. So ist es mit der im folgenden beschriebenen Methode möglich, den Einfluß von Giften sowie denjenigen von in der Augenheilkunde eingeführten Medikamenten in genauer Dosierung zu beobachten. Mit allen in vivo durchgeführten Methoden läßt sich die therapeutisch mögliche bzw. notwendige Dosis von Aceclidin am Gewebe in vielen Fällen nur schätzen. SCHRECK wies 1956 darauf hin, daß der chronische Gebrauch von Cholinesterasehemmern Linsentrübungen und Netzhautschädigungen nach sich ziehen kann. KREJCI und HARRISON brachten kultivierte Hornhautepithelien unmittelbar mit Pilocarpin, Carbachol und Neostigmin in Berührung, wobei sie eindeutig toxisch wirkten. Versuche von GREEN und DOWNS zeigten die Konzentration von Pilocarpin im Kammerwasser nach Anwendung verschiedener Trägersubstanzen auf.

Bei den eigenen Versuchen fand eine Konzentration von Aceclidin Anwendung, welche gerade noch geringes Wachstum der Gewebe zuließ. Diese lag mit 0,25 % oder $2,5 \times 10^{-3}$ g/ml verhältnismäßig hoch. PILZ, LOMMATSCH und ULRICH maßen Schwellenwerte von 10^{-7} bis 10^{-8} g/ml; die von GREEN und DOWNS gemessene Konzentration von $3,5 \times 10^{-5}$ g/ml in der Vorderkammer nach konjunktivaler Applikation war niedriger als die eigene angewandte.

B MATERIAL UND METHODEN

I. Gewebekultur und ihre Möglichkeiten

1. Morphologie der Zellkulturen

a) Linsengewebe im Verband und in der Kultur

Das Linsenepithel liegt unter der Vorder- und Äquatorialfläche der Linsenkapsel, die Linsen-hinterfläche bleibt zellfrei. Morphologisch unterscheiden WANKO, HOGAN eine Wachstumszone an der Äquatorialfläche und eine Zone an der Vorderfläche. So nimmt die Mitoserate von der äquatorialen Fläche bis hin zur zentralen Vorderfläche ab (HOGAN). Die poly- und hexagonalen Zellen am vorderen Linsenpol besitzen einen runden oder ovalen Kern, der nahe dem Linsenkortex liegt. Zur Peripherie hin werden die Epithelzellen schmaler und zylindrischer (DUKE-ELDER). Die äquatorialen Zellen werden länger und bilden neue Linsenzellen (HOGAN). Der Übergang von der langen, kubischen, äquatorialen, epithelialen zur neu gebildeten bandähnlichen Zelle beginnt mit der Ausweitung des basalen Anteils und des Kerns (COHAN, WANKO, DUKE-ELDER, HOGAN). Der ausgeweitete basale Fortsatz wandert rückwärts entlang der inneren Kapseloberfläche, während die Zellspitze sich unter die innere Oberfläche der benachbarten Epithelzelle anfügt. Eine andauernde Zellneubildung bewirkt, daß vorangehende Zellgenerationen mehr und mehr in den Kortex verschoben werden und dabei ihren Kern mitnehmen. Möglicherweise bilden diese Nuklei eine Zone, den Linsenbogen. Schließlich verlieren die tiefsten Zellen ihren Kern, wenn sie in den Linsenkern inkorporiert werden. Die Struktur des Linsenepithels wurde von WERNECK

1834 zum ersten Mal dargestellt und von BRINI 1952 genauer studiert. Demnach besitzen die normalen poly- oder hexagonalen Zellen einen runden oder ovalen Kern. Dazwischen finden sich regelmäßig pyknotische Nuclei. Nur vereinzelt sind sternförmige Zellen erkennbar, deren Protoplasma viel und deren Kern wenig Farbstoff annehmen. Eine dritte Zellsorte besteht aus auffallend hellen, einzeln oder in Gruppen liegenden Gebilden (DUKE-ELDER, LESSON). Ihre Gestalt soll mehr rund sein als bei den übrigen. BRINI zufolge könne jedoch ein helles Protoplasma solcher Zellformen leicht mit intracellulären Hohlräumen verwechselt werden.

FRANÇOIS und RABAEY gelang es mit Hilfe einer besonderen Phasenkontrastbeleuchtung, zwei Zelltypen zu identifizieren, die den ersten beiden von BRINI abgebildeten glichen. Die Deutung derartiger Befunde bereitete bisher allen Autoren Schwierigkeiten, da es sich auch um verschiedene Umwandlungsformen ein und derselben Zellart handeln kann.

In der umfassenden Beschreibung des Linsenepithels durch ROHEN kommt auch die Meinung zum Ausdruck, daß es keine eindeutige Typengliederung innerhalb der Zellen des Linsenepithels gebe. In Übereinstimmung damit sah OBERMANN wie auch HANSSON mit Hilfe der dreidimensionalen Elektromikroskopie (scanning technic) unter der Capsula lentis die einzelnen, etwa $10\text{ }\mu$ großen Zellen wie Pflastersteine nebeneinander liegen. ROHEN fielen zonale Unterschiede auf: Einerseits flache, ungeordnete, blasse Zellen im Zentrum, andererseits streifenförmig angelegte, höhere und wachstumsaktivere Zellen am Rande. In letzteren fand FRIEDBURG die höchsten Enzymaktivitäten. MURATA bestätigte diese Ergebnisse bei der Bestimmung der Aconitaseaktivität in einzelnen Teilen von Kälber- und Rinderlinsen.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß es sich bei den aufgezählten Zellformen um funktionelle Umwandlungsformen bzw. -stufen des Epithels handelt. WANKO und GAVIN fielen eine Zunahme der seitlichen Verzahnung der Zellen

äquatorialwärts auf. ASANO unterscheidet auch in Höhe des Äquators mehrere Zellarten. Die erste zeichnet sich durch eine große Kern-Plasma-Relation und einen großen Nucleolus aus; in ihnen sind nur wenige Mitochondrien und kaum ein Golgi-Apparat zu erkennen. Eine zweite Sorte zeigt eine ausgesprochen kleine Kern-Plasma-Relation; diese Zellen enthielten reichlich Ergastoplasma und Mitochondrien. Die cytoplasmatische Grundsubstanz erscheint fadenförmig. Von ASANO wurde auch die Umwandlung der Epithelzellen in Fasern unter Verlust der Zellorganellen veröffentlicht. WILLIS und HOLLENBERG beschrieben, wie bei der Reifung der Linsenfasern der Kern stufenweise schwindet. In solchen Elementen aus der Äquatorgegend fanden REEDER und BELL Ribonucleinsäuren außergewöhnlicher Stabilität. Nach KOBAYASHI geht die Umwandlung jüngerer in ältere Linsenfasern in typischer Weise vor sich: sie werden mit zunehmendem Schwund von Zellorganellen wie Desmosomen und intracytoplasmatischen Filamenten schmaler, unregelmäßiger, bekommen unscharfe Membranen und vermehrte Interdigitationen. Bei der Umwandlung der Zellen mag die von VIRMAUX, MANDEL, URBAN beobachtete Transport-Ribonucleinsäure eine Rolle spielen, welche nach KINSEY Temperaturempfindlichkeit aufweist. Näheres über die elektronenmikroskopische Feinstruktur der Linsenfasern wurde von HUECK und KLEINFELD beschrieben.

Wie vielen anderen, so erschienen WEISSENFELS die in vitro teilungsfähigen Zellen als ein nahezu ideales Modell für Grundlagenversuche. Schließlich machen sie durch den Wegfall der Korrelationskräfte des Herkunftsorganismus rasch eine Rückdifferenzierung durch. Dadurch wird es möglich, sie im ursprünglichen Zustand zu studieren. Nachdem KIRBY 1927 - soweit übersehbar - als erster die Möglichkeit zur Züchtung der Linsenepithelien mitgeteilt hatte, befaßte sich BAKKER bereits 1936 mit der Umformung derselben während einer Kultur in vitro.

Elektronenoptische Bilder des Linsenepithels lassen einen

Aufschluß über den jeweiligen Zustand der Zellkulturen unter Versuchsbedingungen zu. Nach Untersuchungen von U. MAYER besteht eine Übereinstimmung mit anderen Beobachtungen, daß sich die Epithelzellen der Äquatorgegend deutlich von den zentral gelegenen unterscheiden. Bei den polwärts liegenden Zellen erscheint die Kern-Plasma-Relation eindeutig größer (1). Diese Zellart bot ein rundliches bis ovales Aussehen, ihr Cytoplasma wies reichlich Vakuolen auf. Im Gegensatz hierzu ließen die Epithelien der Äquatorgegend der Linse einen dichteren, ovalen, teilweise gelappt aussehenden Kern sowie ein wabiges, an kleineren Vakuolen reiches Cytoplasma erkennen (2).

Die elektronenoptische Untersuchung sichert eindeutig den Befund, daß das Linsenepithel auf Änderung des Nährmediums, der Temperatur, des osmotischen Druckes und des Sauerstoffpartialdruckes der Umgebung empfindlich reagiert. Nach dem notwendigen Transport vom Schlachthof ins Labor der Klinik befanden sich die Epithelzellen der Linse rein morphologisch degenerativ verändert. Selbst nach möglichst schneller Verarbeitung des gewonnenen Materials (maximal 4 Stunden) wiesen die Zellen eine große Anzahl kleiner Vakuolen und vakuolig gequollenen Ergastoplasmas auf. Zudem fanden sich die Kerngrenzen teilweise verwaschen und an manchen Stellen blieb kaum die einschichtige Lagerung der Zellen erkennbar. Außerdem scheint beim Transport der Bulbi im gekühlten Behälter eine Veränderung des Linsenkernes einzutreten: an den Linsen fiel eine Trübung des

(1) Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird auf die Habilitationsschrift von MAYER, U. (Erlangen 1974, Abb. 18 a) verwiesen.

(2) ebenda, Abb. 19 a.

Kernes auf, die sogenannte Kältekatarakt, die nach Erwärmung allmählich schwand.

HANNA, CALVIN und TRAUNFELDER sahen bei Hamstern, welche in Narkose oder post mortem untersucht wurden, ebenfalls derartige Alterationen des Linsenepithels: unter zunehmender Trübung vermehrten sich die Vakuolen, wobei das endoplasmatische Retikulum und die Membranen anschwellen.

Jedoch erwiesen sich die oben genannten Veränderungen als weitgehend rückgängig, wenn die Linsen oder ihr Epithel in ein geeignetes Kulturmedium gebracht wurden. Nach 3 Tagen (3) zeigten die Kerne eine klare Doppelmembran, das Cytoplasma immer noch viele, aber kleinere Vakuolen, Mitochondrien und Mikrofibrillen. An einigen Stellen waren neben Elementen mit pyknotischem Kern langgestreckte erkennbar, welche einen großen ovalen Kern relativ schwacher Dichte aufwiesen (4).

Am 5. Tag der Inkubation erschien das Bild kaum verändert. An den Häutchen haftend und am Boden des Kulturgefäßes fanden sich die ovalen, leicht gelappten Kerne der Linsenepithelien wieder, durch eine Membran scharf begrenzt. Das Cytoplasma wies neben zahlreichen Mitochondrien ein teilweise gequollenes endoplasmatisches Retikulum auf. Zudem wurden wirbelförmig angeordnete Bündel von Fibrillen in einem Kranz von Vakuolen angetroffen. Bei ihnen könnte es sich um neu gebildete Fasern, möglicherweise auch um Ansatzstellen der Zonulafasern, handeln. Daneben waren endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, ein Golgi-Apparat und möglicherweise sogar ein Zentrosom zu beobachten.

(3) Vgl. MAYER, U.: a.a.O., Abb. 21.

(4) ebenda, Abb. 22.

Auf der in toto inkubierten Linse ließ sich nach 3 Wochen noch die normale Struktur der zentralen Zellen photographieren (U. MAYER).

Bei der biomikroskopischen Untersuchung behalten die mit dem Kapselhäutchen abgezogenen Zellen der Linse 2 Tage lang ihre ursprüngliche Gestalt - im durchfallenden Licht kugelförmig bis polygonal. Ebenso zeigten die im Verband von ihrer Unterlage abgehobenen und frei im Medium schwimmenden Zellen keine morphologischen Alterationen. Im Gegensatz dazu veränderten Einzelzellen, welche sich am Boden des Glases ansiedelten oder am Häutchen haften blieben und sich am Rande einer "Zellichtung" befanden, sehr bald ihre Form. An ihnen erschienen Protoplasmaausläufer und vakuolige, gelbliche bis bräunliche Einschlüsse.

Des weiteren zeigt sich eindeutig, daß sich in der Kultur sowohl die zentralen als auch die mehr am Äquator lentis gelegenen Zellen in fibroblasten-ähnliche Gebilde umwandelten. Wie oben gesagt, kann es sich demnach bei den beschriebenen morphologischen Unterschieden um einzelne Entwicklungsstufen auf dem Weg der Linsenepithelzelle zu einer Linsenfaser handeln. Eine derartige Annahme steht im Einklang mit Untersuchungen von ROHEN, BRINI, OBERMANN, HANSSON, WILLIS und HOLLENBERG, WANKO und GAVIN, ASANO, KOBAYASHI.

U. MAYER gelang es mit Hilfe einer automatischen Photoeinrichtung, das Zellwachstum, die morphologischen Veränderungen während einer Zellkultur über mehrere Tage zu dokumentieren. Nach einem Intervall von etwa 15 Stunden hatten fast alle Zellen einer Kultur eine Teilung durchgemacht.

Eine Publikation von SALLMANN's enthält folgende Werte für den Mitoseindex in Linsen junger Ratten: 26 auf 1000 am Äquator, 1,6 auf 1000 praeäquatorial und 2 auf 10000 zentral. MIKULICZ und YOUNG fiel in deren Epithel

nach 10,5 Stunden eine DNA-Synthese auf. BITO et al. stellten fest, daß nach 4 Tagen dauernder Behandlung mit Atropin Linseneithelien von Hasen einen signifikanten Anstieg der Mitosen zeigten.

b) Irisgewebe im Verband und in der Kultur.

Die Regenbogenhaut fungiert als Blende für den dioptrischen Apparat des Auges, indem sie die Weite der Pupille reguliert. Hierzu dienen Muskelfasern des M. sphincter pupillae (innerviert vom N. III mit parasympathischen Fasern) sowie des M. dilatator pupillae (sympathische Innervation). Der anatomische Aufbau ihres Ansatzes nimmt Anteil an der Anlage des Trabekelwerkes. Möglicherweise spielt sie zudem eine Rolle für die Ernährung der klaren brechenden Medien.

Das Irisgewebe stammt größtenteils dem Mesenchym ab. Entgegen dem Linsengewebe besteht es nicht aus homogen aufgebauten Zellverbänden.

Es kann in folgende Abschnitte aufgeteilt werden:

1. Vordere Grenzfläche,
2. Stroma, M. sphincter mit Gefäßen,
3. M. dilatator pupillae und
4. hinteres Pigmentepithel.

Die vordere Grenzfläche (1) stellt eine Modifikation des Stromas dar, welche sich vom genannten durch Mangel an Kollagen und Anhäufung von Zellen, besonders Melanozyten, die parallel zur Irisoberfläche angeordnet sind, unterscheidet. An der vorderen Irisoberfläche beschreibt MAGARI spezielle endothelähnliche Zellen mit ganz besonderen physiologischen Funktionen (SCHRECK).

Elektronenoptisch lassen sich an der Grenzfläche 2 Zelltypen unterscheiden: pigmentierte Melanozyten und Fibroblasten. In den dicksten Teilen des vorderen Irisab-

schnittes finden sich besonders zahlreiche Pigmentzellen. Die Blutgefäße entsprechen den Kapillaren und Venolen, wie sie überall in der Iris gefunden werden (MAGARI 1957, TOUSIMIS und FINE 1959, UENO 1961, IWAMOTO 1961, SMELSER und ISHIKAWA 1966).

Nach ROHEN zeigt sich die Irisvorderfläche von Deckzellen mit viel Fortsätzen, welche Fibroblasten ähneln, unter breiter Lückenbildung überzogen. Sie stellen morphologisch eine Zwischenstufe zwischen endothelialen und fibroblastischen Elementen dar. In Versuchen mit chinesischer Tusche und Eisendepots (Methode nach SCHRECK) fand MAGARI 1957, daß dieselben in Bezug auf die Phagozytose sich als nicht sehr aktiv, jedoch reger als echte Endothelien erwiesen.

Das Stroma setzt sich aus Fibroblasten und Melanozyten zusammen; das kollagene Bindegewebe ist locker angeordnet und enthält Mukopolysaccharide als Grundsubstanz. Es führt den Hauptanteil der Blutgefäße, Nerven und freien Zellen der Iris. Unter den freien Zellen dominieren Mastzellen, Histiozyten und Rundzellen. Die Faserelemente des Stromas sind nahezu ausschließlich kollagener und präkollagener Natur. Lichtmikroskopisch ließ sich eine sehr regelmäßige und geordnete Bindegewebsarchitektur nachweisen (ROHEN 1951, PURTSCHER 1963).

Das Irisstroma steht mit dem Kammerwasser durch viele schmale Öffnungen in der vorderen Grenzfläche in Verbindung. Da die kollagenen Fibrillen so locker im Irisstroma angeordnet sind, ist es nicht überraschend, daß Partikel von 50 - 200 μ m Größe weit in das Stroma diffundieren können. Ein Großteil der Grundsubstanz des Irisstromas wird gewöhnlich während der Präparation des Gewebes zerstört, so daß nahezu leere Räume innerhalb der Kollagenfibrillen zu finden sind. Hauptsächlich lassen sich folgende Zellen im Stroma finden: Fibroblasten, Melanozyten, Mastzellen, Makrophagen,

Lymphozyten.

Die vordere endothel-ähnliche Schicht (3) und der M. dilatator pupillae bilden eine Lage von ca. 12,5 μ m. Ein Teil der Zellen setzt sich aus einem epithelialen apikalen und einem muskulären basalen Teil, welcher in das Irisstroma hineinragt, zusammen. Die Zellen des hinteren pigmentierten Epithels (4) behalten ihren epithelialen Charakter im Laufe des Lebens bei. Diese Schicht ist so reich pigmentiert, daß es Schwierigkeiten bereitet, Details des Zytoplasmas zu erkennen.

Frisch gewonnene Zellen aus Kälbern bieten folgende Bilder: Im Cytoplasma sind mehrere kleine bis mittelgroße Vakuolen enthalten. Neben den zahlreichen Mitochondrien fällt eine Anzahl Pigmentkörner auf. Es findet sich ein dichtes Endoplasmatisches Retikulum. In der Nähe des ovalen Kernes erkennt man ein Chromatinhäufchen, wobei es sich um den Nukleolus handeln kann. Anscheinend enthält die Irisvorderfläche unterschiedliche Zellarten. Neben den großen pigmentreichen Zellen mit ovalem Kern existieren noch etwas kleinere mit einem dichteren gelappten und chromatinreicheren Nukleus, wobei diese anscheinend besonders reich an Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien sind (5). Der pigmentarme Typus hat einen gelappten Kern, der pigmentreiche multiple Vakuolen im Cytoplasma.

In der Gewebekultur verhält sich das Irisgewebe wesentlich anders als das Linsenepithel. Nach U. MAYER zeigte es zum Zeitpunkt des Anwachsens im Gefäß eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Erschütterungen sowie Temperaturschwankungen. Weitere Beobachtungen erbrachten, daß erst

(5) Vgl. MAYER, U.: a.a.O., Abb. 5

nach 5 Inkubationswochen ein eigenes Wachstum der Iriszellen zu finden war (U. MAYER). Nach 5 Monaten konnte man in den Kulturen von Irisgewebe eine Neubildung von Fasern beobachten, wobei sich strangartige Zellzüge oft untereinander verwoben.

Aufgrund der unterschiedlichen Zellelemente und Strukturen erscheint es verständlich, daß Iriskulturen nicht so einheitlich aussehen wie diejenigen von Linsenepithelien. So fielen U. MAYER in Irisgewebekulturen mehr oder wenig längliche Zellen auf, deren Protoplasma viel Pigmentgranula enthält. Manche Zellformen erschienen prall gefüllt mit gelblichen Granula, andere sahen mehr strangförmig oder faserig aus. Diese könnten dem Irisstroma entstammen. Wieder andere Zellarten bildeten ein polygonales Muster und erinnerten dem Aussehen nach an Endothelien. Eine Abstammung von den Endothelzellen der Blutgefäße der Iris ließ sich nicht sicher ausschließen.

2. Stoffwechselphysiologie der Zellkulturen

a) Irisgewebe

Nach JAKOLEV zeigen Gewebe mit aktivem Stoffwechsel (Iris, Ciliarkörper) die schnellste Absorption von Sauerstoff, hingegen läßt sich an Geweben mit schwächerer Intensität der oxidativen Prozesse (Hornhaut, Kammerwasser, Linse, Glaskörper) eine langsamere Absorption von O_2 feststellen.

Daß der O_2 -Verbrauch isolierter Linsenepithelien ungeahnt hoch lag, konnte U. MAYER 1969 erstmals im Respirometer nach WARBURG nachweisen. Überdies zeigte sich, daß der Sauerstoffverbrauch des Irisgewebes ungefähr ein Viertel des Verbrauches an Sauerstoff der Linsenepithelien betrug.

Wie früher erwähnt, besteht das Irisgewebe aus physiologisch vielseitigen Geweben wie Stroma-, Muskel-Gefäß-Gewebe im Gegensatz zu der homologen, an der Linsenkapsel haftenden, einschichtigen Zellart. Je größer die von der Nährflüssigkeit umspülten Gewebsoberflächen waren, d.h. je kleinere Stückchen in das WARBURG-Spirometer gebracht wurden, desto mehr Sauerstoffverbrauch war zu verzeichnen. Je einheitlicher die Gewebestückchen in ihrer Größe und Gewicht waren, desto weniger Abweichungen zeigten die Messungen (U. MAYER).

b) Linsengewebe

In der Literatur niedergelegte Erfahrungen legen den Schluß nahe, daß der Sauerstoffverbrauch der Linse fast ausschließlich in der Schicht des Epithels stattfindet (ELY, MURATA, MAYER).

Das Kapselhäutchen und der Linsenkern verbrauchten nach Messungen von U. MAYER im WARBURG-Apparat keinen

Sauerstoff.

Nach BONTING sollen 26,4 % des Feuchtgewichtes von Kapselhäutchenpräparaten auf Linsenepithelien entfallen. Von überlebendem Linsenepithel läßt sich ebenso wie der Sauerstoffverbrauch auch die Kohlendioxydfreisetzung bestimmen. Gleichzeitige Messung von Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxydfreisetzung zeigen bei vorausgehenden Untersuchungen von U. MAYER einen Atmungsquotienten von $\frac{CO_2}{O_2}$ von 1,04. Dieser läßt auf ein normal atmendes Gewebe schließen, welches seinen Energiebedarf hauptsächlich aus Kohlehydraten deckt.

II. Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes

1. Präparation:

Zur Untersuchung gelangten unmittelbar post mortem gewonnene Bulbi vom Kalb. Sie wurden in Kühlbehältern bei $+ 2^{\circ}\text{C}$ bis $+ 6^{\circ}\text{C}$ ins Labor gebracht und innerhalb der folgenden 2, maximal 4 Stunden unter sterilen Bedingungen präpariert. Somit ließen sich die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen postmortalen Alterationen (U. MAYER et al.) möglichst gering, vor allem aber reversibel halten. Der zu verarbeitende Bulbus erhielt eine gründliche Spülung mit Aqua dest. bzw. physiologischer Kochsalzlösung und wurde auf eine sterile Petrischale mit keimfreier Zellstoffunterlage gelegt. Anschließend ließ sich unter Beibehaltung steriler Kautelen (Instrumente, Mundschutz) die Vorderkammer am Limbus mit einer Rasierklinge eröffnen und die Hornhaut mit Schere und Pinzette vollständig abtragen. Somit lag die Iris frei und ließ sich mit einer Faßpinzette entnehmen. In einer Petrischale wurde sie dann in 3 - 6 mg schwere Stückchen zerteilt.

Vor der Entnahme des Linsenepithels erfolgte die vollständige Entfernung der Iris. Auf der nun freiliegenden Linse ließ sich das Epithel durch einen zirkulären Schnitt entlang dem Äquator ausschneiden. Zur Wahrung der Sterilität durfte nicht direkt am Äquator präpariert werden, sondern etwa ca. 0,5 mm in Richtung des Poles. Das Kapselhäutchen mitsamt dem anhaftenden Epithel ließ sich leicht abziehen. Dies durfte jedoch nicht zu rasch geschehen, da sonst ein Teil der Zellen nicht mit abgelöst wurde und an der Rinde haften blieb.

2. Medium:

Von MERRIAM und KINSEY (1950) stammt eine Zusammenstellung bewährter Inkubationsmedien. Als Kulturmedium diente in

dieser Versuchsreihe TCM 199 mit 20 % Kälberserum. Weitere Zusätze bestanden in einer Antibiotikallösung aus Penicillin und Streptomycin sowie Natriumbikarbonat als Puffer gegen die Säure der Aceclidin-Lösung. Als Farbindikator diente das dem TCM 199 serienmäßig beigegegebene Phenolrot, welches jeweils einen Farbumschlag nach orange-gelb ($\text{pH} < 7$) bzw. rot-violett ($\text{pH} > 7,2$) anzeigte. Hiermit ließ sich ein einwandfreier Versuchsablauf gewährleisten, da nur bei konstantem, physiologischem pH eine ausreichende Atmung und Wachstum möglich sind. Im zu beschreibenden Versuchsaufbau wurde dem Medium Aceclidin in einer Konzentration von 0,5 bzw. 0,25 % vor dem Sterilfiltrieren zugesetzt.

3. Mikrospirometerapparatur nach WARBURG

Als technische Ausrüstung stand das WARBURG-Respirometer zur Verfügung. Das physikalische Prinzip der Methode nach WARBURG nutzt die Konstanthaltung des Gas- und Flüssigkeitsvolumens zur Messung des Anstiegs bzw. Abfalls des Partialdruckes eines jeweils interessierenden Gases. Die verfügbaren Apparate trugen die Typenbezeichnung KOD 44 S 52. Die verwendbaren Gefäße faßten etwa 5 - 7 ml Flüssigkeit; der Seitenarm blieb unbenutzt, der Mitteltrog nahm 0,2 ml PARDEE-Lösung auf. Diese ließen sich mit einem Manometer verbinden und in ein Wasserbad mit konstanter Temperatur ($36,5^{\circ}\text{C}$) - nach VOADEN im etwa oberen Optimalbereich - eintauchen. Als Manometerflüssigkeit diente BRODIES-Lösung, wobei normaler Druck von 365 mm Hg einer Säule von 10.000 mm entspricht. Die jeweilige Konstante - für Sauerstoff bei einer Füllung von 2 ml und einer Temperatur von $36,5^{\circ}\text{C}$ - wurde nach den Gasgesetzen entsprechend einer Formel errechnet, welche UMBREIT, BURRIS und STAUFFER empfohlen. Jeder Versuchsansatz bestand aus 14 Kombinationen von

Gefäß und Manometer, durchnummeriert von 0 - 13. Die beiden ersten Einheiten wurden lediglich mit 2 ml Medium beschickt und fungierten als Thermobarometer.

Atmosphärischer Druck sowie die Temperatur des Wasserbades als auch der Umgebung sind Schwankungen unterworfen. Da diese Änderungen sich direkt auf die zu messenden Werte der restlichen Einheiten übertragen und somit falsch erhöhte bzw. erniedrigte Werte anzeigen, muß der Mittelwert der Thermobarometer direkt abgelesen und von den übrigen Verrechnungen abgezogen werden.

Die Gefäße ließen sich auf folgende Weise am besten reinigen: ein ca. 10 Stunden dauerndes Bad in Chromschwefelsäure entfernte sämtliche Rückstände vom Glas. Die mit einer Zange entnommenen Gefäße wurden anschließend mehrere Stunden gründlich unter fließendem Leitungswasser gewässert. Es folgte dann ein dreimaliges Auskochen der Gefäße mit Aqua dest., um eventuelle Reste, welche die Gewebekultur empfindlich stören, zu entfernen. Die dann in einem Spezialschrank getrockneten Gefäße wurden zu ihren Stöpseln sortiert, in Metallfolie verpackt und 4 Stunden lang bei 180°C sterilisiert.

Vor den Versuchen waren die Mikrogefäße durch den am Schliff eingefetteten Stöpsel und ein mit einem passenden Gummistopfen zu verschließen, mit 1,8 ml Medium zu beschicken und abzuwiegen. Nach dem Einbringen des zu untersuchenden, unter sterilen Bedingungen gewonnenen Gewebes konnte durch erneutes Wiegen dessen Gewicht bestimmt werden. Dabei war es günstig, den Zeitraum zwischen dem jeweiligen Wiegen möglichst kurz zu halten, da das Medium auch bei längerem Stehen verdunstete. Hierbei hätten falsche erniedrigte Gewichtsangaben des zu studierenden Gewebes entstehen können. Anschließend waren 0,2 ml einer auf einen CO₂-Partialdruck von etwa 1 % berechneten PARDEE-Lösung (UMBREIT, BURRIS, STAUFFER) in den Mitteltrog zu pipettieren. Lief hierbei auch nur eine Spur des "Puffers" über den Rand des Troges in das Medium, so wurde

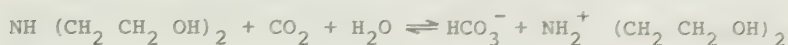
dieses alkalisch und die Gewebe starben ab. Die vorbereiteten Gefäße ließen sich mit einer Klammer am eingefetteten Ansatzschliff der Manometer luft- und wasserdicht befestigen, so daß die einzelnen Einheiten in das vorher auf $36,5^{\circ}\text{C}$ aufgeheizte Wasserbad gebracht werden konnten. Nun mußte ca. 1 Stunde gewartet werden, bis Medium und Gewebe sich der Temperatur des Wasserbades angeglichen hatten. Nach Verschuß der Manometerhähne konnte die Messung beginnen. Ablesungen erfolgten morgens und abends. Hierbei wurden die Manometerhähne nach dem Ablesen geöffnet, so daß Druckausgleich in beiden Manometerarmen herrschte und sie neu eingestellt und geschlossen werden konnten; danach liefen die Messungen weiter.

Bei den ersten Serien erfolgte aus jeder Gefäß-Manometer-einheit eine Sterilitätsprobe. Später galten Gefäße, an denen ein übernormaler Mediumverbrauch mit vorzeitiger Ansäuerung des TCM-Mediums aus einem Farbumschlag des Indikators ins Gelbe zu erkennen war, als verunreinigt und schieden aus. Die biomikroskopische Betrachtung vermittelte am Ende der Versuchsserien ein Urteil über Art und Ausmaß des Gewebewachstums.

Um nicht allein die Größe des Sauerstoffverbrauches, sondern auch seine Abhängigkeit vom Einfluß einer Substanz zu prüfen, dienten mindestens die Gefäß-Manometer-Einheiten 1 bis 4 als Kontrolle des Normalwertes. Dies erwies sich als notwendig, weil eine Verzögerung beim Transport der Bulbi, ihrer Präparation oder beim Einbringen der beschickten Gefäße in den vorgeheizten WARBURG-Apparat das zu untersuchende Gewebe schädigen konnte und somit nicht jede Serie inkubierten Gewebes gleiches Wachstum aufwies. Aus den oben erwähnten Kontrollen war zu entnehmen, inwieweit noch sauerstoffverbrauchendes Gewebe vorlag, dessen Atmung mit jener des gleichen Gewebes in anderem Kulturmedium verglichen werden konnte.

Die Methode nach PARDEE stellt eine manometrische Methode

zur direkten Messung des O_2 -Verbrauches dar. Dabei ist es möglich, die Sauerstoff-Aufnahme von Zellen bei der Atmung zu messen, obwohl gleichzeitig Kohlendioxyd abgegeben wird. Sie beruht auf dem Gebrauch eines sogenannten CO_2 -Puffers (im Mitteltrog des Gefäßes), der in der Gasphase einen konstanten CO_2 Partialdruck einhält. Ein sogenannter PUFFER nach PARDEE besteht aus einer wässrigen Lösung von Diäthanolamin, die Kohlendioxyd nach folgender Gleichung reversibel bindet:



Jede Kohlendioxydbildung durch Metabolismus vollzieht sich in der Gleichung von links nach rechts, Kohlendioxydverbrauch ruft die umgekehrte Reaktion hervor.

Auf diese Weise kann das Gewebe in einem konstanten Partialdruck von CO_2 atmen; freigesetztes CO_2 wird durch den "Puffer" absorbiert, aufgenommenes CO_2 hingegen vom "Puffer" freigesetzt.

Der von uns verwendete CO_2 -Puffer" enthält nach PARDEE für jeden einzelnen Ansatz 6 ml Diäthanolamin, 15 mg Thioharnstoff, 3 g $KHCO_3$, 2,2 ml 6-n HCL und 6,8 ml H_2O . 0,2 ml dieser alkalisch reagierenden Lösung fanden ihren Platz im Mitteltrog der Gefäße. Die frisch angesetzte Lösung blieb zu baldigem Verbrauch bestimmt, längstens innerhalb drei Wochen, da sie hygroskopisch war und somit im Laufe der Zeit an Wirksamkeit verlor. Beobachten ließ sich diese Eigenschaft gut im Laufe des Versuches am Mitteltrog der Gefäße, deren Volumen nach 4 - 5 Tagen sichtlich anstieg. Des weiteren ließ sich beobachten, daß bei Versuchsbeginn nach dem Pipettieren des Puffers in den Mitteltrog bei normalem pH von 7,2 - 7,3 die vorher durch Phenolrot orangefarbene Lösung im Laufe der ersten beiden Stunden einen rötlichen Schimmer bekam; dies bedeutete eine Verschiebung des pH ins Alkalische mit Umschlag der Färbung des Indikators Phenolrot. Da bei vorsichtigen Pipettieren kein "Puffer" über den Rand lief und die Farbände-

rung des Mediums erst nach 1 - 2 Stunden zustande kam, liegt die Annahme nahe, daß dieser Farbumschlag durch die Einstellung des Partialdruckes im System auf 1 % CO₂ erfolgte.

4. Biomikroskopie

Die Zellkulturen erfolgten in LEIGHTON-Röhrchen, die sich wegen ihres abgeflachten Bodens besonders zur biomikroskopischen Beobachtung im umgekehrten Mikroskop von LEITZ eigneten.

Das zu züchtende Gewebe wurde in 4 ml TCM-Medium in die Röhrchen gebracht und anschließend im Inkubator bebrütet bei 36,5°C. Linsenepithel wuchs in der Regel rascher als Irisgewebe, bei welchem erst nach ca. 14 Tagen Inkubation Wachstum nachzuweisen war.

Hier ließ sich auch gut der Zusatz verschiedener Pharmaka, in unserem Fall Aceclidin, auf Gewebekulturen und deren Einfluß auf die Morphologie und das Wachstum beobachten.

5. Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen der gemessenen und berechneten Werte wurden Mittelwerte $\bar{x}_n$ und Standardabweichungen s_n bzw. 95 % Konfidenzbereiche bestimmt. Die Anzahl der x_1 bis x_n Einzelwerte schwankte zwischen 25 und 35. Um an den verschiedenen Tagen jeweils einander entsprechende Reihen miteinander vergleichen zu können, ließen sich t-Tests für unverbundene Stichproben durchführen. D.h., es wird getestet, ob die Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ zweier normal verteilter Grundgesamtheiten innerhalb der Fehlergrenze liegen oder darüberhinausreichend voneinander abweichen. Nach LINDNER und KREYSZIG ergaben sich für

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

wobei N_1 , N_2 die Anzahl der Stichproben waren und für

$$s^2 = \frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \left[\sum_{i=1}^{N_1} (x_{1i} - \bar{x}_1)^2 + \sum_{i=1}^{N_2} (x_{2i} - \bar{x}_2)^2 \right]$$

Überschreiten die berechneten t-Werte die für verschiedene Irrtumswahrscheinlichkeiten p tabellierten, so läßt sich folgern, daß die geprüften Reihen im Mittel mit der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit p voneinander abweichen. Der Unterschied wurde als signifikant bezeichnet, wenn p kleiner als 0,01 ausfiel. Der t-Test erscheint anwendbar, da bei der beschriebenen Versuchsanordnung beide Stichproben als voneinander unabhängig gelten können und ihre Standardabweichungen etwa gleich groß sind.

Anwendung des t-Tests wie bei MAYER: Habilschrift 1974
Herrn Peter KYR, Wiss. Ass. Fachbereich Werkstoffwissen-
schaften der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für
seine freundliche Unterstützung bei der Berechnung der
Statistik.

C. ERGEBNISSE

I. Konzentration von Aceclidin in der Kultur

Da Glaukostat ^R mittlerweile einen festen Platz in der Therapie des Glaukoms besitzt, steht die Frage zur Diskussion, inwieweit es bei chronischer Anwendung Veränderungen des Stoffwechsels empfindlicher Augenabschnitte hervorzurufen vermag.

Bei der Anwendung von Glaukostat ^R am Auge verwendet man eine 2 %-ige Lösung.

Die Wirksamkeit verschiedener Miotika wird im allgemeinen mit derjenigen einer bestimmten Pilocarpin-Dosis verglichen (HARRIS, DRANCE und Mitarbeiter).

So wählte der Verfasser analog zu ähnlichen Versuchen mit Pilocarpin (MAYER) Konzentrationen von Aceclidin im Nährmedium von 1 %, 0,5 % und 0,25 %.

Der pH der örtlich angewandten Aceclidinlösung lag zwischen 2 und 4. In diesem Bereich wachsen Zellkulturen nicht an. So war es in den eigenen Versuchen notwendig, nach Zugabe der jeweiligen Glaukostat ^R-Konzentration das Nährmedium mit Natriumbikarbonat erneut auf einen pH-Wert von etwa 7,2 zu puffern. Denn nur bei physiologischem pH erscheint Atmung und Wachstum ausreichend gewährleistet. Zum Nachpuffern waren in unserem Fall 0,025 g NaHCO₃ auf einen Versuchsansatz von 100 ml notwendig.

In den eigenen Versuchen zeigte sich, daß nach Zugabe von 1 %-igem Aceclidin in der Gewebekultur kein Zellwachstum nachzuweisen war. Bei der biomikroskopischen Untersuchung (Abb. 1) ließen sich abgestorbene Linsenepithelzellen nachweisen, Zellwachstum war nicht sichtbar. Vergleichbare Untersuchungen der Iris zeigten in diesem Beobachtungszeitraum biomikroskopisch keine Veränderung, da das Wachstum der Iriszellen sehr viel langsamer von statten geht. Ebenso ließ sich von der täglich verbrauchten Menge an Sauerstoff

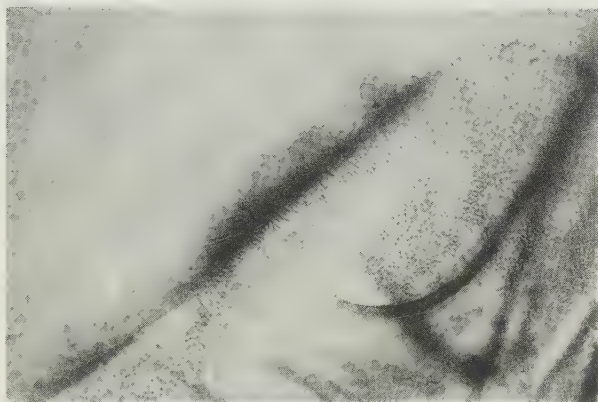


Abb. 1 Linsenepithelkultur nach 5 Tagen unter Zusatz von 1 % Aceclidin. Großteils abgestorbene Zellen

im WARBURG-Apparat auf ein Absterben oder zumindest auf eine hochgradige Atmungshemmung schließen. Auch nach 2 - 3-wöchigem Bebrüten der Kulturen konnte kein Zellwachstum beobachtet werden.

Bei der Senkung der Dosis auf 0,5 % blieb das Bild weitgehend unverändert. Jedoch ließen sich bereits vereinzelt überlebende Zellen beobachten. Ein ausreichendes Wachstum hingegen war auch hier nicht feststellbar. Der O_2 -Verbrauch pro mg Gewebe/Stunde fand sich regelmäßig subnormal. Auch nach mehrwöchigem Bebrüten war eindeutiges Zellwachstum weder bei Linsenepithel noch bei Irisgewebe sichtbar (Abb. 2).

Bei analogen Versuchen mit gleichen Pilocarpinkonzentrationen konnte im Groben ein ähnliches Verhalten gesichert werden (U. MAYER).

Gibt man nur 0,25 mg Aceclidin auf 100 ml Nährlösung und puffert mit 0,02 g 0,25 %-iger Natriumbikarbonatlösung ab, so lassen sich biomikroskopisch normale überlebende und wachsende Epithelzellen erkennen (Abb. 3). In dieser Verdünnung zeigte auch Irisgewebe nach mehrwöchiger Inkubation deutliches Wachstum. Auch zeigen die Gewebe im WARBURG-Mikrospirometer eine ausreichende Atmung, so daß sich bei dieser Konzentration eine pharmakologische Untersuchung anbietet. Sie liegt gerade an der Grenze der Toxizität.

Bei den folgenden Meßergebnissen wird der O_2 -Verbrauch von Kapselhäutchenpräparaten gewonnen. Nach BONTING entspricht der zelluläre Sauerstoffverbrauch dem Vierfachen der gemessenen Werte, er entspricht dem der Linsenepithelien ohne Kapsel.

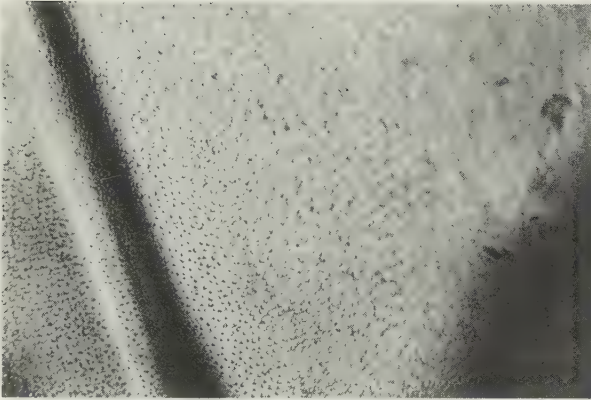


Abb. 2 Linsenepithelkulturen nach 5 Tagen unter Zusatz von 0,5 % Aceclidin. Auf dem Epithelhäutchen überlebender Zellverband, jedoch kein Zellenwachstum

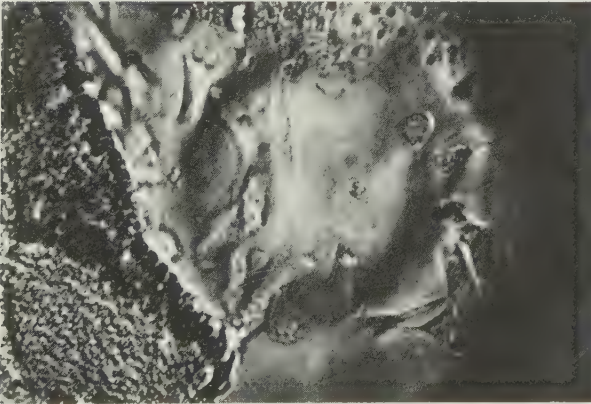


Abb. 3 Linsenepithelkulturen nach 5 Tagen unter Zusatz von 0,25 % Aceclidin. Überlebende und gewachsene Zellen

II. O₂-Verbrauch von Linsenepithel und Irisgewebe

Die Messungen erfolgten bei beiden genannten Geweben über einen Zeitraum von 5 Tagen.

1. Ohne Zusatz von Aceclidin zeigte der tägliche O₂-Verbrauch von Linsenepithel folgende Werte auf: am ersten Tag der Messungen war ein verhältnismäßig geringer O₂-Verbrauch festzustellen (0,068 μ l O₂/mg/h); dies beruht wahrscheinlich auf dem Anwachsen und Gewöhnen der Epithelhäutchen an das neue Medium. Am zweiten und dritten Tag ließ sich ein deutlicher Anstieg der Atmung verzeichnen, wobei am dritten Tag die Atmung ihr Maximum (0,078 μ l O₂/mg/h) erreichte. An den beiden darauffolgenden Tagen fiel möglicherweise wegen des aufgebrauchten Nährmediums die O₂-Absorption stetig ab (0,075 - 0,063 μ l O₂/mg/h).

Aus Tabelle 1 und Graphik 1 lassen sich, wie in den folgenden Tabellen, die an beiden Kollektiven erhaltenen Meßwerte, die Standardabweichungen sowie die entsprechende Irrtumswahrscheinlichkeit entnehmen. Die jeweils aufgeführten Histogramme zeigen die absoluten Häufigkeiten für das stetige Merkmal Sauerstoffverbrauch in μ l pro mg Gewebe in der Stunde. Sie wurden von den Tagen der Messung angefertigt, welche jeweils einen signifikanten Unterschied zeigen (Abb. 4, 5, 6).

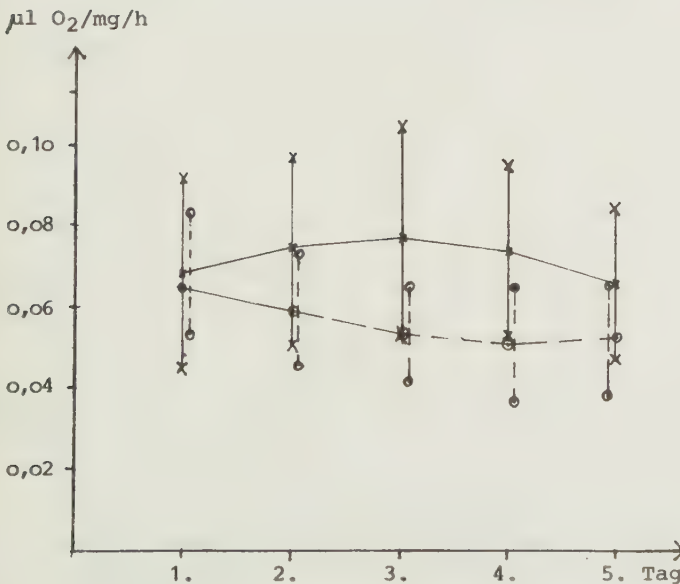
Vergleichend hierzu lief nun unter den gleichen Bedingungen der Versuchsansatz mit jeweils 0,25 %-iger Aceclidinkonzentration:

Hier ließ sich am ersten Tag kaum ein Unterschied des Sauerstoffverbrauches feststellen (0,066 μ l O₂/mg/h). Deutlicher trat ein solcher an den darauffolgenden Tagen auf: zu dem Zeitpunkt der maximalen O₂-Aufnahme ohne Medikamentenzusatz konnte man bei den Vergleichsansätzen mit Aceclidin eine deutlichere Atemhemmung feststellen, mit dem Maximum am dritten bzw. vierten Tag (Tab. 1 , Graphik 1).

O₂-Verbrauch in µl/mg Gewebe/h

	Linseneipithel	mit 0,25 % Aceclidin	P
1. Tag	0,068	0,066	zu groß
2. Tag	0,075	0,059	zu groß
3. Tag	0,078	0,054	0,001
4. Tag	0,075	0,051	0,001
5. Tag	0,063	0,053	zu groß

Tab. 1 Gegenüberstellung des Sauerstoffverbrauches von Linseneipithel ohne und mit 0,25 %-Aceclidin



Graphik 1 Graphische Darstellung der vorangehenden Tabelle. Arithmetisches Mittel von x = 35 und o = 28 Einzelwerten bei einem Konfidenzbereich von 95 %.

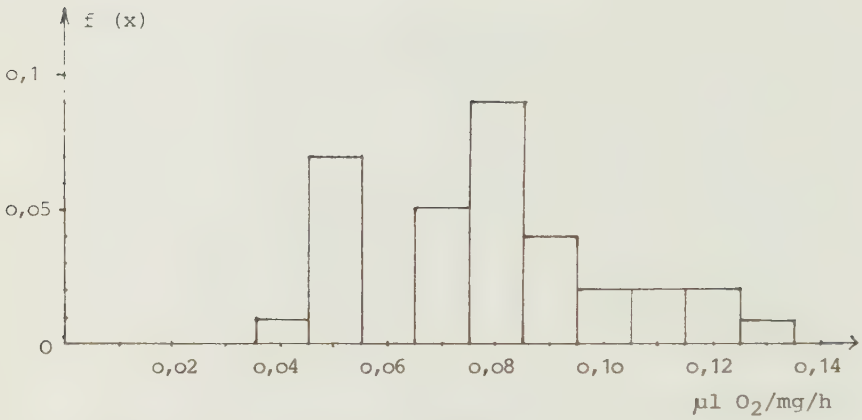


Abb. 4 a Histogramm der Meßwerte des 3. Tages:
Linsenepithel ohne Aceclidin

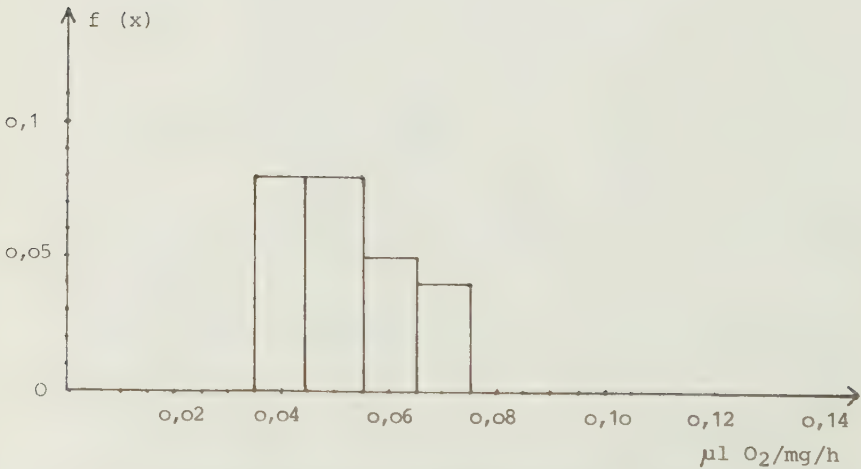


Abb. 4 b Histogramm der Meßwerte des 3. Tages:
Linsenepithel mit 0,25 % Aceclidin.

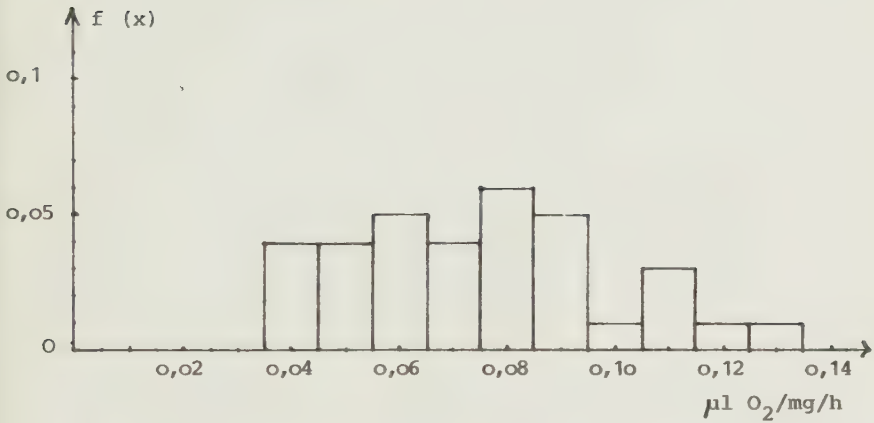


Abb. 5 a Histogramm der Meßwerte des 4. Tages:
Linsenepithel ohne Aceclidin

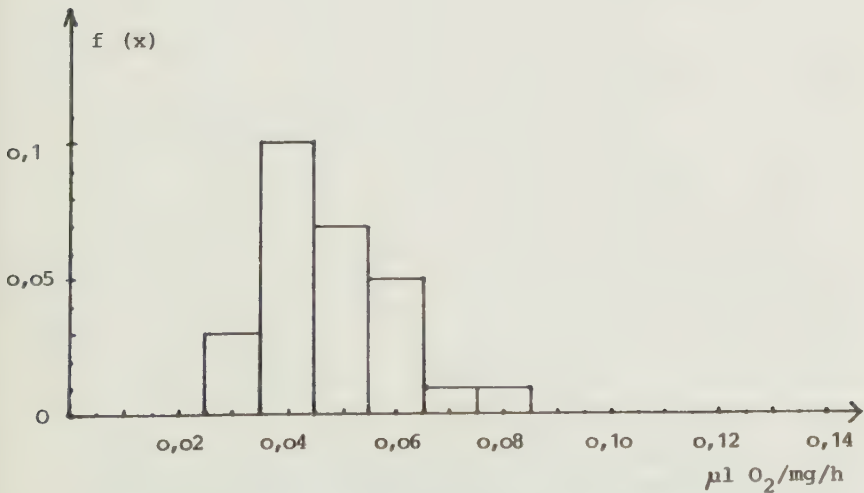


Abb. 5 b Histogramm der Meßwerte des 4. Tages:
Linsenepithel mit 0,25 % Aceclidin

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsansätzen, der an den restlichen Tagen nicht nachweisbar war. Hierbei hat man zu berücksichtigen, wie oben schon erwähnt, daß die Gewebeelemente am 1. Tag noch nicht genügend in die neuen Wachstumsbedingungen gewöhnt sein können und am 5. Tag in der beschriebenen Versuchsanordnung das Nährmedium größtenteils verbraucht ist. So erbringen lediglich Tag 2, 3 und 4 schlaussche Werte mit ausreichend geringer Irrtumswahrscheinlichkeit. Sie sprechen eindeutig für eine Atemhemmung der Linsenepithellen durch Aceclidin.

2. Analoge Experimente mit Irisgewebe zeigten folgende Ergebnisse auf:

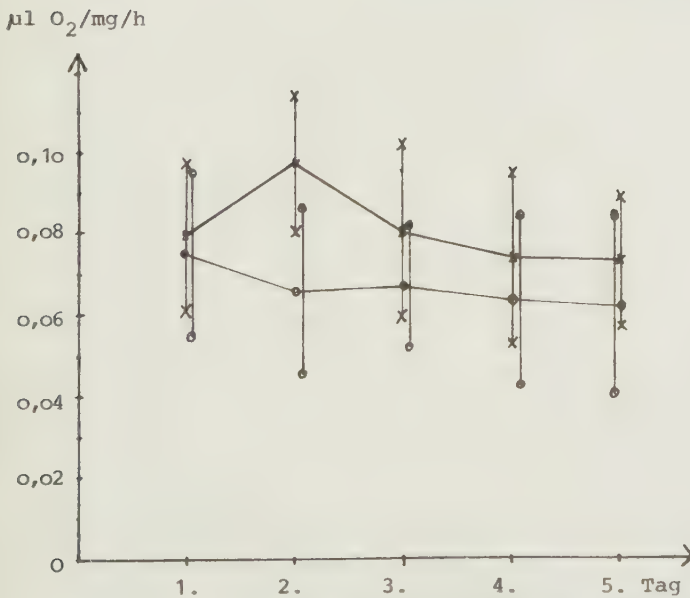
Ohne Zusatz von Glaukostat^R war am 2. Tag ein Maximum an Atmung zu verzeichnen ($0,095 \mu\text{l O}_2/\text{mg h}$), welches in den darauffolgenden Tagen sich auf die Werte um $0,074 \mu\text{l O}_2/\text{mg h}$ einpendelte. Auffallend war hier im Vergleich zum Linsenepithel das starke Ansteigen des O_2 -Verbrauches am 1. Tag. Ähnliches Verhalten wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben (H. MAYER). Im gleichen Versuchsansatz liefen nun Irisgewebekulturen mit $0,25 \mu\text{g}$ -Aceclidinzusatz.

Hier zeigte sich am 2. Tag der Messungen ein signifikanter Unterschied des O_2 -Verbrauches; ebenso fand sich auch am 5. Tag eine deutliche Atemhemmung. Auffällig war im Verlauf der Versuche die Verminderung der O_2 -Aufnahme durch Aceclidin am Tage des größten O_2 -Verbrauches. Offensichtlich greift Aceclidin besonders während der produktiven Phase der Gewebekultur ein. Die Atemhemmung wird ab dem 3. Tag scheinbar überwunden und erreichte nun durchschnittliche Werte um $0,084 \mu\text{l O}_2/\text{mg h}$ (Tab. 1 Graphik 1). Aus der Tabelle und der graphischen Darstellung lassen sich der eindeutig hemmende Einfluß des Aceclidins auf den O_2 -Verbrauch entnehmen. Er findet sich um etwa ein Drittel

O_2 -Verbrauch in $\mu l/mg$ Gewebe/h von Irisgewebe

	Irisgewebe	mit 0,25 % Aceclidin	p
1. Tag	0,079	0,075	0,05
2. Tag	0,095	0,064	0,001
3. Tag	0,08	0,067	0,05
4. Tag	0,074	0,0625	0,05
5. Tag	0,0735	0,061	0,05

Tab. 2 Gegenüberstellung des Sauerstoffverbrauchs von Irisgewebe ohne und mit 0,25 % Aceclidin



Graphik 2 Graphische Darstellung der vorangehenden Tabelle. Arithmetisches Mittel von x = 32 und o = 29 Einzelwerten bei einem Konfidenzbereich von 95 %

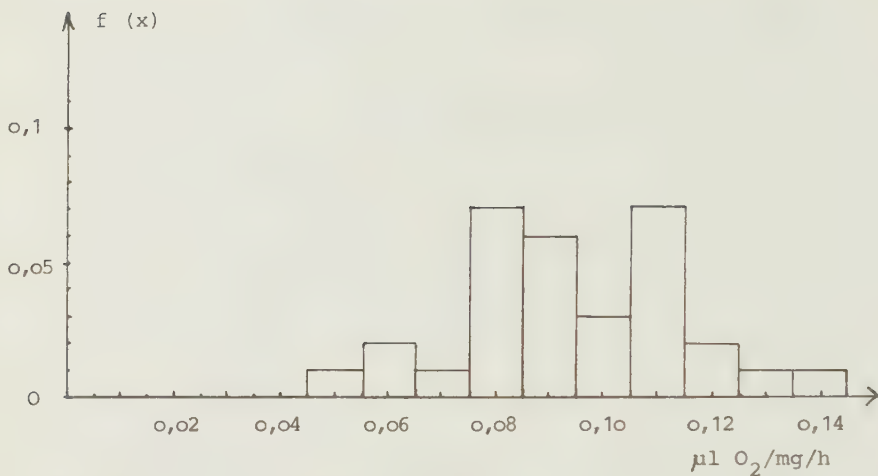


Abb. 6 a Histogramm der Meßwerte des 2. Tages:
Irisgewebe ohne Aceclidin

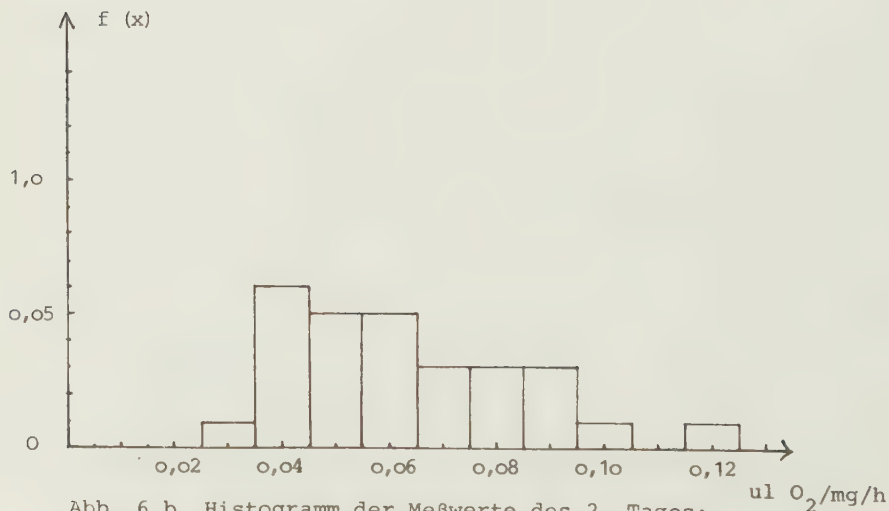


Abb. 6 b Histogramm der Meßwerte des 2. Tages:
Irisgewebe mit 0,25 %-Aceclidin

bis ein Viertel gemindert.

Abb. 7 und 8 zeigen eine Gegenüberstellung der Tage des größten O_2 -Verbrauches und der signifikanten Hemmung der Atmung durch Aceclidin. In unserem Fall bei der Linse am 3. und 4., bei dem Irisgewebe am 2. Tag.

$\mu\text{l O}_2/\text{mg/h}$

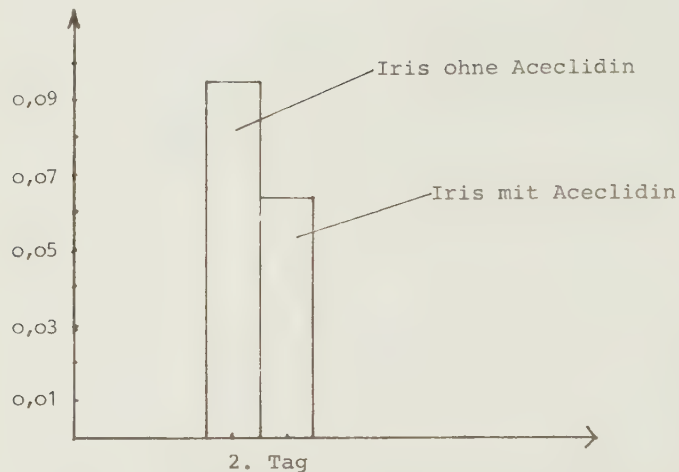


Abb. 7 Gegenüberstellung des O_2 -Verbrauches von Irisgewebe ohne und mit Glaukostat R

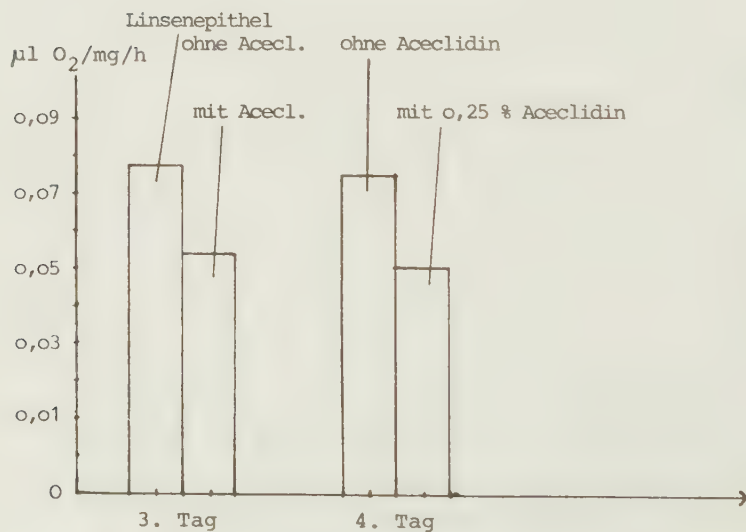


Abb. 8 Gegenüberstellung des O_2 -Verbrauches von Linsenepithel ohne und mit 0,25 % Glaukostat R

III. Vergleich mit anderen Substanzen

Aus analogen Versuchen mit Pilocarpin 0,25 % war ein Verbrauch von einem Drittel der normalen Sauerstoffmenge beim Linsenepithel zu verzeichnen, Irisgewebe hingegen hatte einen doppelt so hohen Verbrauch (MAYER).

Bei Zusatz von Naphtochinon wurde die O_2 -Absorption beider Gewebe in gleicher Weise vermindert. Linsenepithel zeigte eine um die Hälfte und Irisgewebe eine geringfügige Herabsetzung der Atmung (MAYER).

Methylprednisolon verhält sich wiederum anders: die Atmung des Linsenepithels zeigte sich nur am 3. Inkubationstag signifikant verringert, diejenige des Irisgewebes an allen Beobachtungstagen eindeutig auf die Hälfte reduziert (U. MAYER und Mitarbeiter).

JAKOLEV et al. fanden heraus, daß Pilocarpin und Phosphakol die oxidativen Prozesse in den Geweben des Auges unterdrücken. Die Absorptionskennziffer des Sauerstoffs verminderte sich beim Kammerwasser durchschnittlich um 37 %, bei der Linse um 53 %, bei der Iris um 74 %.

In den eigenen Versuchen war eine Reduzierung der O_2 -Aufnahme an den Tagen des größten Verbrauches der untersuchten Gewebe - bei der Linse am 3. Tag, Iris am 2. Tag - um etwa 30 % zu verzeichnen.

D. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

In der Literatur wird das Linsenepithel als atmungsaktives Gewebe beschrieben, das etwa viermal mehr Sauerstoff als das Irisgewebe verbraucht (MAYER); die Atmungsintensität des Linsenepithels liegt etwa 50-fach so hoch wie diejenige der ganzen Linse. Dies ist auch mit den eigenen Messungen und Beobachtungen in Einklang zu bringen. Es handelt sich demnach um ein Gewebe, das auf Störungen des Sauerstoffverbrauches besonders empfindlich reagieren kann. HOCKWIN stellt ganz unterschiedliche Noxen heraus, welche eine Linsentrübung auslösen oder beschleunigen können. Erwie-senermaßen vermögen z.B. Medikamente, wie z.B. Cortison, Cytostatica, systematisch oder lokal am Auge angewandt, eine Katarakt hervorzurufen. Offen blieb diese Frage bisher für manche häufig angewandten Pharmaka des Auges, die oft über lange Zeitdauer Anwendung finden. Hier könnte die Untersuchung des Sauerstoffverbrauches in manchen Fällen Aufschluß geben. Offen blieb allerdings, ob die jeweils meßbare Verminderung der O_2 -Absorption als deren primärer Effekt oder als Ausdruck ihrer insgesamt toxischen Eigenschaften zu deuten ist.

In der Literatur beschriebene Experimente sowie eigene Beobachtungen zeigen, welch ein spezifisches oder nur begrenzt überlebensfähiges Gewebe das Linsenepithel darstellt. Schon geringe Alterationen beeinträchtigen dessen normale Funktion, u.a. die Atmung, die zur Aufrechterhaltung der Durchsichtigkeit der Linse dient.

Biochemisch bestehen zwischen Linsenepithel- und Irisgewebe erhebliche Unterschiede, die sich aus dem jeweiligen Aufbau und der Funktion erklären. Bei gleichartigen Versuchen

mit Naphtochinon, Methylprednisolon, Pilocarpin zeigte sich immer eine eindeutige Atemhemmung des Linsenepithels. Das Irisgewebe reagierte auf Medikamenteneinfluß größtenteils mit Atemhemmung, aber auch mit einer Zunahme derselben z.B. bei Pilocarpinzusatz; bedenkt man noch zusätzlich den heterogenen Aufbau dieses Gewebes, so sind oben genannte Ergebnisse durchaus denkbar, da die fermentative Aktivität des Irisgewebes äußerst komplex sein dürfte. Eine so deutliche Hemmung des O_2 -Verbrauches wie beim Katarakt-auslösenden Naphthochinon konnte in den dargestellten Versuchen bei beiden Geweben nicht festgestellt werden, wohl aber ähnlich wie dort eine gleichartige Hemmung der Atmung, welche allerdings beim Irisgewebe geringfügiger ausfiel.

Ähnliche Veränderungen zeigten sich bei der Untersuchung des Cortisons, wobei sich die Iris als stärker betroffen erwies. Eine kompensatorische, gegensinnige Steigerung wie beim Irisgewebe unter Pilocarpinzusatz ließ sich in den geschilderten Versuchen nicht aufzeichnen.

Die Vielfalt der Stoffwechselfunktionen und der Unterschied in der enzymatischen Aktivität erklären die Fähigkeit zum Überleben durch Ausgleich und Aufrechterhalten der Funktion. Scheinbar treten erst Störungen des Gleichgewichtes ein, wenn grobe oder summierte Schädigungen auf beide Gewebe einwirken (HOCKWIN).

E. ZUSAMMENFASSUNG

In dem WARBURG-Mikrospirometer ließen sich Linsenepithel und Irisgewebe über mindestens 5 Tage am Leben halten bzw. zeigten ein Wachstum, welches biomikroskopisch und photographisch darzustellen war. Die vorhergehend beschriebene Versuchsanordnung ermöglichte es, den normalen Stoffwechsel der Gewebe im direkten Vergleich unter dem Einfluß von Aceclidin zu studieren.

Bei der biomikroskopischen Untersuchung konnte beim Linsenepithel nach 3 - 5 Tagen ein ausreichendes Wachstum beobachtet werden, das Irisgewebe fand sich nach 1 Woche in unveränderter Gestalt. Eine Verdünnung von 0,25 % Aceclidin stellte die toxische Grenze dar, bei welcher sich Überleben und Atmung der Gewebe noch beobachten ließen. Diese bildete somit die experimentell verwendete Dosis.

Aus den gewonnenen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Aceclidin greift in den oxydativen Stoffwechsel der Gewebe ein und hemmt signifikant den Sauerstoffverbrauch. Dies zeigt sich beim Linsenepithel am 3. und 4. Tag, bei der Iris am 2. und 3. Tag der Inkubation. Das Linsenepithel reagiert empfindlicher auf Aceclidinzusatz als Irisgewebe. Offensichtlich besitzt letzteres aufgrund seines heterogenen Aufbaues eine größere Vielfältigkeit des Stoffwechsels; möglicherweise verfügt es über Entgiftungsfunktionen.

Während beim Linsenepithel ab dem 2. Tag der Versuche mit Aceclidin ein stetiges Abnehmen der Atmung zu verzeichnen war, fiel beim Irisgewebe ab dem 3. Tag ein verminderter O_2 -Verbrauch auf, der dann aber verhältnis-

mäßig konstant blieb. Wie früher erwähnt, ist das durch Diffusion ernährte Linsenepithel leicht Alterationen unterworfen (vgl. S. 12) und ist verhältnismäßig wenig regenerationsfähig.

Aus den beschriebenen Ergebnissen ist es möglich, Aceclidin mit anderen Substanzen zu vergleichen. Es läßt sich durchaus in die Reihe der früher von MAYER untersuchten Medikamente wie Pilocarpin, Naphthochinon, Methylprednisolon einordnen. Es zeichnet sich durch eine verhältnismäßig geringe Toxizität aus, die ähnlich derjenigen des Pilocarpins ist. Hingegen fehlt die kompensatorische Steigerung des O_2 -Verbrauches, welche sich beim letztgenannten herausstellte. Die Wirkung des Aceclidins steht eher in einer Reihe mit derjenigen des Cortisons, bei welchem sich allerdings das Linsenepithel stärker befallen zeigte. Eine so starke Hemmung der Atmung wie bei den Versuchen mit Naphthochinon trat nicht ein.



LITERATURVERZEICHNIS

=====

- ABRAMSON, D. H., COLEMAN, D.J., FORBES, M. und FRANZEN, L.A.: Effect on the anterior Chamber and Lens Thickness: Pilocarpine Arch. Ophthalm. Bd. 87, S. 615 - 620 (1972)
- ALTMANN, Ph.L. und DITTMER, D.S.: Metabolism. Fed. of American Societies for Experimental Biology. Bethesda-Maryland, S. 385 - 397 (1968)
- Arzneimittelforschung: Bd. 13, S. 306 - 312
- ASHTON, N., SHAKIB, M. COLLYER, R. und BLACK, R.: Electron mikroskopische Studie of Pseudoexfoliation of the Lens Capsule. I. Lens Capsule and zonular Fibers. Invest. Ophthalmol. Bd. 4, S. 141 - 161 (1965)
- BAGCHI, M., ROTHSTEIN, H. und STEIN, G.S.: Synthesis of Macromolecules in epithelial Cells of the cultured amphibian Lens. Exp. Cell Res. Bd. 50, S. 454 - 479 (1968)
- BAKKER, A.: Eine Methode, die Linsen erwachsener Kaninchen außerhalb des Körpers am Leben zu erhalten. Arch. Ophthalm. Bd. 135, S. 581 - 592 (1936)
- BASTIDE, P., TRONCHE, P., ROUHER, F.: Arzneimittelforschung Bd. 18, S. 322 - 324 (1968)
- BEHRENS, B., KARBER, G.: Arch. exp. Path. Pharmacol. S. 177, 379 (1935)
- BITO, L.Z., DAVSON, H. und SNIDER, N.: The Effects of autonomic Drugs on Mitosis and DNA-Synthesis in the Lens Epithelium and on the Composition of the aqueous Humor Exp. Eye Res. Bd. 4, S. 141 - 161 (1965)
- BLOEMENDAL, H., SCHOENMAKERS, J., ZWEERS, A., MATZE, R. und BENEDETTI, E.L.: Polyribosomes from Calf Lens Epithelium Biochim. Biophys. Acta Bd. 123, S. 217 - 220 (1966)
- BÜCKE, W.: Zelle im Phasenkontrast Z. Zellforschung Bd. 38, S. 428 ff. (1953)

- BOURS, J.: The Presence of Lens Crystallines as well as Albumine and other Serum Proteins in Chick Iris Tissue Extracts
Exp. Eye Res. Bd. 15, S. 299 - 319 (1973)
- BROLIN, S.E., DIDERHOLM, H. und HAMMAR, H.: An autoradiographic Study on Cell Migration in the Exe Lens Epithelium
Acta Soc. Med. Upsalien Bd. 66, S. 43 - 48 (1961)
- BRINI, A.: L'épithélium antérieur du cristallin humain normal vu par la méthode de l'étalement
Bull. Soc. Ophthal. Fr., S. 675 - 678 (1952)
- BRYAN, A., LEINFELDER, C.L., MELTZER, M.: Effects of Gases upon Cell Growth.
Arch. Ophthal. Bd. 63, S. 108 - 115 (1960)
- CHARLTON, J.M., VAN HEYNINGEN, R.: Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase in the mammalian Lens
Exp. Eye Res. Bd. 11, S. 147 - 160 (1971)
- COHEN, A.J.: Electronmicroscopic Observations on the Lens of the Albino Mouse
Amer. I. Anat. Bd. 103, S. 219 - 249 (1958)
- COHEN, A.J.: The Electronmicroscopy of the normal human Lens
Invest. Ophthalmol. Bd. 4, S. 433 - 466 (1965)
- COTLIER, E.: The mitotic Cycle of the Lense Epithelium. Arch. Ophthal. (Chicago) Bd. 68, S. 801 - 809 (1962 b)
- DEMAILLY, P.: Arch. Ophthal. Bd. 28, S. 735 - 744 (1968)
- DEMAILLY, P.: Arch. Ophthal. (Paris), Bd. 31, S. 225 - 234 (1971)
- DIETERICH, C.E., WITMER, R. und FRANZ, H.E.: Iris and Circulation of aqueous Humor. Albrecht von GRAEFE's Klin. und exper. Ophthal. Bd. 182, S. 321 - 340 (1971)
- DRANCE, S.M., FAIRCLOUGH, M. und SCHULZER, M.: Dose Response of human intraocular Pressure to Aceclidine, Arch. Ophthal. Bd. 88, S. 394 - 396 (1972)

- DUKE-ELDER, Sir S.: System of Ophthal. II, S. 318
(1961), Verlag H. KIMPTON
- ELY, L.O.: Metabolism of the cristallin
Lens. II. Respiration of the
intact Lens and its separated
Parts. Amer. I. Ophthalmol. Bd. 32,
S. 220 - 223 (1949)
- ELY, L.O., ROBBIE,
W.A.: The cyanide Sensitivity and
Cytochrome c Content of the
crystalline Lens. Amer. I. Ophthal-
mol. Bd. 33, S. 269 - 272 (1950)
- ETIENNE, R., BARUT, Ch.,
GONZ, L.E.S., BOUCHON,
J.: Ann. Ocul. Vol. 200, No. 3, S. 287
- 292 (1967)
- FAURE, J.P., KIM, Y.Z.,
GRAF, B.: Formation of giant Cells in the
corneal Endothelium during its
Regeneration after Destruction
by Freezing. Exp. Eye Res. Bd. 12,
S. 6 - 12 (1971)
- FAWATT, Don W.: Die Zelle. Ein Atlas der Ultra-
struktur. Verlag URBAN und
SCHWARZENBERG, S. 448 (1969)
- FRANCOIS, J. und
RABAEY, M.: Phase-Contrast-Microscopy.
Modern Trends Ophthal. Bd. 3,
S. 1 - 4 (1949)
- FRIEDBURG, D.: Die Aktivität von Enzymen des Ener-
gie liefernden Stoffwechsels in
klaren und getrübbten Augenlinsen.
Habilitationsschrift, Düsseldorf
(1968)
- FROOMBERG, D. und
VOADEN, M.: An Investigation of mitotic Control
in the Rabbit Lens Epithelium.
Exp. Eye Res. Bd. 1, S. 1 - 9
(1966)
- GIERTHY, J.F. und
ROTHSTEIN, H.: Cell Disorganization and Stimulation
of Mitosis in cultured Leopard Frog
Lens. Cell Res. Bd. 64, S. 170
- 178 (1971)
- GIERTHY, J.F., BOBROW,
S.N. und ROTHSTEIN, H.: Microscopy of Living epithelial
Cells upon the intact ocular Lens
in Culture. Exp. Cell Res. Bd. 50,
S. 476 - 479 (1968)
- GRAYMORE, C.N.: Metabolic Survival of the isolated
Retina. Brit. Med. Bull. Bd. 26,
S. 130 - 133 (1970)
- GREEN, K., DOWNS, S.J.: Ocular penetration of Pilocarpin in
Rabbits. Arch. Ophthal. Bd. 93
S. 1165 - 1168 (1975)

IV

- HANSSON, H.A.: Ultrastructure of the Surface of the Iris in the Rat Eye. Z. Zellforschung. Mikrosk. Anat. Bd. 110, S. 192 - 203 (1970)
- HANSSON, H.A.: Scanning Electron Microscopy of the Lens of the adult Rat. Z. Zellforschung Bd. 107, S. 187 - 198 (1970)
- HARDING, C.V., ROTH-STEIN, H. und NEWMANN, M.B.: The Activation of DNA-Synthesis and Cell Division in Rabbit Lens in Vitro. Exp. Eye Res. Bd. 1, S. 457 - 465 (1962)
- HARDING, C.V., REDDAN, J.R., UNAKARA, N.J. und BACCHI, M.: The Control of Cell Division in the ocular Lens. Int. Rev. Cytol. Bd. 31, S. 215 - 299 (1971)
- HARDING, C.V., WILSON, W.L., WILSON, J.R., REDDAN, J.R. und REDDY, V.N.: Triggering of the Cell Cycle in an organized Tissue in vitro. J. Cell Comp. Physiol. Bd. 72, S. 213 - 220 (1968)
- HARRIS, J.E.: Problems in Drug Penetration in LEOPOLD, J.H.: Symposium on ocular Therapie Bd. 3, S. 99 ff. (1968)
- HOCKWIN, O., LICHT, W. und NOLL, E.: Veränderungen verschiedener Fermentaktivitäten in Linsen von Meerschweinchen mit zunehmendem Lebensalter. Albrecht von GRAEFE's Arch. klin. und exp. Ophthal. Bd. 167, S. 158 - 168 (1964)
- HÖLLER, D.: Klin. Mbl. Augenheilkunde, Bd. 154, S. 92 - 94 (1969)
- HOWARD, A.: Whole Mounts of Rabbit Lens Epithelium for cytological Study Stain Technol. Bd. 27, S. 313 - 315, (1952)
- HUECK, A. und KLEINFELD, O.: Ein elektronenmikroskopischer Beitrag zur Feinstruktur der Linsenfaser. Albrecht von GRAEFE's Archiv klin. und exp. Ophthal. Bd. 160, S. 20 - 25 (1958)
- JABLONSKY, W.: Über Änderungen und Zellstrukturen unter dem Einfluß des Mediums in Reinkulturen von Epithel in vivo. Arch. Biol. (Liège), S. 251 - 283 (1949)

- JAKOLEV, A.A.: Die Untersuchung der Sauerstoffspannung in den Geweben und im Kammerwasser des Auges mit Hilfe der Polarographie. Albrecht v. GRAEFE's Arch. klin. und exp. Ophthal. Bd. 185, S. 108 - 118 (1972)
- KINSEY, V.E.: Amino-Acid Transport in the Lens Invest. Ophthalmol. Bd. 4, S. 691 - 699 (1965)
- KINSEY, V.E., WACHTL, C., CONSTANT, M.A., COMACHO, E.: Studies on crystalline Lens; mitotic Activities in Epithelia of Lenses cultured in various Media. Amer. I. Ophthalmol. Bd. 40, S. 216 - 223 (1955)
- KIRBY, D.B.: The Cultivation of Lens Epithelium in vitro. J. Exp. Med. Bd. 45, S. 1009 - 1016 (1927) und Arch. Ophthal. Bd. 56, S. 450 ff.
- KIRBY, D.B., ESTEY, K. und TABOR, F.: Cultivation of Lens Epithelium in vitro. A further Study. Arch. Ophthal. Bd. 1, S. 358 - 365 (1929)
- KORTE, J., KUHLMANN, K. und HOCKWIN, O.: Die in vitro-Wirkung von Oxyphenbutazon auf den Kohlenhydratstoffwechsel von Rinderlinsen. Albrecht v. GRAEFE's Arch. klin. exp. Ophthal. Bd. 183, S. 244 - 250 (1971)
- KOVÁČIK, L., MRÁZOVÁ, E., JEŽEK, L.: Acetylcholine de corps ciliaire des bovins et actions cholinergique de la pilocarpine. Arch. Ophthal. (Paris) Bd. 36, S. 249 - 252 (1976)
- KREJCI, L., HARRISON, R.: Antiglaucoma Drug Effects on Corneal Epithelium. Arch. Ophthal. Bd. 84, S. 766 - 769 (1970)
- KREYSZIG, E.: Statistische Methoden, 4. Aufl. S. 107 - 247 (1973). Verlag VANDEN-HOECK und RUPRECHT (Göttingen)
- LESSON, T.S.: Lens of the Rat Eye: An Electron microscopic and Freeze-Etch Study Exp. Eye Res. Bd. 11, S. 78 - 82 (1971)
- LEYDHECKER: Zur Geschichte des Glaukoms. Klin. Mbl. für Augenheilkunde Bd. 170, S. 144, Heft 2
- LICHTER, P.R.: Iris Processes in 340 Eyes. Amer. I. Ophthalmol. Bd. 68, S. 872 - 878 (1969)
- LIEBERMANN, Th. und IRVING, L.: The use of aceclidine in the treatment of glaucoma; ref. n. ETIENNE, R. und ROUHER, F.: Rapport d'expertise clinique Centre hospitalier univ. de Clermont-Ferrant Clinique Ophthal.

- LINDNER, A.: Statistische Methoden, S. 93 (1964), BIRKHÄUSER Verlag, Stuttgart und Basel
- LINDNER, E. und BÜKE, W.: Elektronenmikroskopische Bilder des Linsenepithels und ihre Beziehung zur Struktur der lebenden Zelle. Z. Zellforschung Bd. 40, S. 8 - 24 (1964)
- MAGARI, S.: Zur Struktur des Stromas der Iris und zur Frage eines Endothels an ihrer Vorderfläche. 61. Ber. der Deutsch.-Ophthal. Ges. in Heidelberg, S. 314 - 316 (1957)
- MAMO, J.G. und LEINFELDER, P.J.: Growth of Lens Epithelium in Culture: I. Characteristics of Growth. Arch. Ophthal. Bd. 59, S. 417 - 419 (1958)
- MANN, J.: Tissue Culture of Mouse Lens Epithelium. Brit. J. Ophthal. Bd. 32, S. 591 - 596 (1948)
- MATSUURA, H. und WATANABE, T.: Electron microscopic Studies of the Processes of Lens Fibers with the Replica Method. 3. Observation on the Processes of human Lens Fibers. Folia Ophthal. Jap. Bd. 20, S. 1131 - 1134 (1969)
- MARTIN-SMITH, M., SMAIL, G., STENLAKE, J.B.: J. Pharm. Pharmacol. Bd. 19, S. 561 - 589 (1967)
- MASHKOVSKY, M.D. und YAKHONTOV, L.N.: Relationship Between the chemical Structure and Pharmacological Activity in a Series of Synthetic Quinuclidine Derivates. Progress in Drug Research Bd. 13, S. 293 - 339 (1969)
- MASHKOVSKY, M.D., ZAITZEVA, K.A.: Farmakol. i Toksikol Bd. 23, S. 398 (1960)
- MAYER, U.: Untersuchungen zur Atmung an überlebendem Linsenepithel. Ber. der Dtsch. Ophthal. Ges. Heidelberg Bd. 70, S. 359 - 361 (1969)
- MAYER, U.: Untersuchungen an Gewebekulturen aus Kälberaugen. Habilitationsschrift (1974), Erlangen

- MAYER, U.: Cortison und Linsenepithel bzw. Irisgewebe. Albrecht von GRAEFE's Arch. klin. exp. Ophthal. Bd. 198, S. 101 - 104 (1976)
- MAYER, U.: Wirkung des Pilocarpins auf den Stoffwechsel von überlebenden Linsenepithelien und Irisgewebe. Klin. Mbl. Augenheilkunde Bd. 168, S. 531 - 537 (1976)
- MEYTHALER, H. und RUPPERT, W.: Vergleichende Untersuchungen über den myopisierenden und miotischen Effekt von Pilocarpin und Aceclidin (Glaukostat R) Albrecht v. GRAEFE's Arch. für klin. und exp. Ophthal. Bd. 181, S. 234 - 245, Heft 3 (1971)
- MORTON, H.J.: A Survey of Commercially available Tissue Culture Media. In Vitro Bd. 6, S. 89 - 108 (1970)
- MÜLLER, H.K., DARDENNE, U., HOCKWIN, O., KLEI-FELD, O. u. SCHAFHAUSEN, G.: Altersbedingte Veränderungen im Stoffwechsel der Linse. 18. Consil. Ophthal. 1958, Belg. Acta Bd. 1, S. 750 - 763 (1959)
- MURATA, T.: Die Aconitaseaktivität in einzelnen Teilen von Kälber- und Rinderlinsen. Albr. von GRAEFE's Arch. klin. exp. Ophthal. Bd. 184, S. 151 - 154 (1972)
- OBBERMANN, A.E.: Scanning Electron Microscopy of the Lens and Zonula Fibers. Amer. I. Ophthalmol. Bd. 72, S. 604 - 607 (1971)
- OGATA, T.: Electron microscopic Studies on Capsule and epithelial Cells of Lens. II. Human senile Cataract. Acta soc. Ophthal. Jap. Bd. 74, S. 549 - 556 (1970)
- PALMER, W.G., PAPACONSTANTINOU, J.: Increase in the Complexity of alpha-Crystallins during Differentiation on Lens Cells. Nature (Lond.) Bd. 219, S. 170 - 172 (1968)
- PAPACONSTANTINOU, J.: Molecular Aspects of Lens Cell Differentiation. Science Bd. 156, S. 338 - 346 (1967)
- PILZ, A., LOMMATSCH, P., ULRICH, W.D.: Experimentelle und klinische Untersuchungen mit Aceclidin (Glaukostat R) Ophthalmologica 168, S. 376 - 391 (1974)

- POMERAT, C.M. und
LITTLEJOHN, L. jr.: Observations on Tissue Culture
of human Eye. South Med. J.
Bd. 49, S. 230 - 237 (1956)
- REDDAN, J.R., CROTTY,
M.W. und HARDING, C.V.: Characterisation of macromolecular
Synthesis in the Epithelium of
cultured Rabbit Lenses. Exp.
Eye Res. Bd. 9, S. 165 - 174
(1970 a)
- REDDAN, J.R., HARDING,
C.V., UNAKARA, N.J.,
BELL, R.M.: Electron Microscopy of cultured
mammalian lenses. Invest. Ophthal-
mol. Bd. 9, S. 496 - 515 (1970 b)
- REMMERT, H.: Biologische Periodik
in: L. von BERTALANFFY und F.
GESSNER: Handbuch der Biologie,
Bd. V, S. 335 - 411 (1965)
- RIEGEL, D., LEYDHECKER,
W.: Klin. Mbl. Augenheilk. Bd. 151,
S. 882 - 885 (1967)
- RILEY, E. und DEVI,
S.K.: Dynamics of Cell Populations in
the Rat Lens Epithelium. Exp. Eye
Res. Bd. 6, S. 383 - 392 (1967)
- ROHEN, J.W.: in: Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen: Das Auge
und seine Hilfsorgane, Bd. III,
S. 4, 239 - 285, 395 - 412 (1964)
SPRINGER-Verlag
- ROMANO, J.H.: Brit. J. Ophthal. Bd. 54, S. 510 -
521 (1970)
- ROOT, W.S., HOFMANN,
F.G.: The Effect of Drugs upon the Eye.
Physiological Pharmacology Vol. II,
S. 329 - 359 (1965)
- SANTAMARIA, L., DRUJAN,
B.D., SVAETICHIN, G.
und NEGISHI, K.: Respiration, Glycolysis and S-Potentials
in Teleost Retina: A comparative Study.
Vision Res. Bd. 11, S. 877 - 887
(1971)
- SCHRECK, E.: Zur intravitralen Modelldarstellung
des Flüssigkeitswechsels im Menschen-
auge. Ber. Dtsch. Ophthal. Ges. Hei-
delberg, Bd. 55, S. 174 - 178 (1949)
- SHAPIRO, A.L., SIEGEL,
J.M. SCHARFF, M.D. und
ROBBINS, E.: Characteristics of cultured Lens
Epithelium. Invest. Ophthalmol.
Bd. 8, S. 393 - 400 (1969)

- SIPPEL, T.O.: Energy Metabolism in the Lens during Aging. Invest. Ophthalmol. Bd. 4, S. 502 - 513 (1965)
- SRINIVASAN, B.D. und HARDING, C.V.: Cellular Proliferation in the Lens. Invest. Ophthalmol. Bd. 4, S. 452 - 470 (1956)
- STEINBACH, H. und NEUBAUER, H.: Handelsübliche Pilocarpinlösungen und ihre Haltbarkeit. Ber. Dtsch. Ophthal. Ges. Heidelberg Bd. 70, S. 557 - 562 (1969)
- STEINBACH, H. und NEUBAUER, H.: Weitere Überprüfungen handelsüblicher Pilocarpinlösungen. Klin. Mbl. Augenheilkunde Bd. 159, S. 281 - 283 (1971)
- TAMURA, S.: Long Term Cultures of Epithelial Cells of a Rabbit Lens. Jap. J. Ophthal. Bd. 9, S. 177 - 181 (1965)
- TONDEUR, R., URBAIN, M.: Chimie thér. Bd. 4, S. 207 ff. (1967)
- TUCKER, D.N., BARRAQUER, F.J. und BARRAQUER, J.I.: Iris Suture in Rabbits. Ann. Ophthal. Bd. 4, S. 979 - 986 (1972)
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H., STAUFFER, J.F.: Manometric Techniques. S. 6 - 17, 28 - 31, 43 - 45 (1964)
Burgess Publishing Company
- van der VEEN, J. und HEYEN, C.F.A.: Lens Cells of the Calf in continuous Culture. Nature Bd. 183, S. 1137 - 1138 (1959)
- VOADEN, M.J.: Effect of Temperature on Cell Division in the culture Rabbit Lens. Exp. Eye Res. Bd. 11, S. 7 - 14 (1971)
- von SALLMANN, L., GRIMES, P. und Mc ELVAIN, N.: Aspects of mitotic Activity in Relation to Cell Proliferation in the Lens Epithelium. Exp. Eye Res. Bd. 1 S. 449 - 456 (1962)
- von SALLMANN, L., GRIMES, P. und ALBERT, D.: Histogenesis of the Lens Capsule in Tissue Culture. Amer. J. Ophthalmol. Bd. 68, S. 435 - 438 (1969)
- WACHTEL, C. und KINSEY, V.E.: Studies on the crystallin Lens. VIII A synthetic Medium for Lens Culture and the Effects of various Constituents on Cell Division in the Epithelium. Amer. J. Ophthalmol. Bd. 46, S. 288 - 293 (1958)

- WANKO, T. und GAVIN,
M.A.: The fine Structure of the Lens
Epithelium. Arch. Ophthal.
Bd. 60, S. 858 - 879 (1958)
- WANKO, T. und GAVIN,
M.A.: Electron Microscope Studies on
the Lens Fibers. Biophys. Bio-
chem. J. Cytol. Bd. 6, S. 91 -
96, (1959)
- WEEKERS, R., COLLIGNON,
J., LUYCKS, J. und
LENNES, G.: Docum. ophthal. (Den Haag) Bd. 26
S. 639 - 647 (1969)
- WENIG, W.: Strukturveränderungen bei Trübun-
gen der Augenlinse. Albrecht v.
GRAEFKE's Arch. klin. exp. Ophthal.
Bd. 185, S. 343 - 348 (1972)
- WILLIS, N.R., HOLLEN-
BERG, M.J. und BRAEKE-
VELT, C.R.: The fine Structure of the Lens of
the fetal Rat. Canad. J. Ophthal.
Bd. 4, S. 307 - 319 (1969)
- WILSON, W.L., HARDING,
C.V. und WILSON, J.R.: Quantitative Studies on the Stimu-
lation of Mitosis and DNA-Synthesis
in the cultured Rabbit ocular Lens.
Exp. Eye Res. Bd. 6, S. 343 - 350
(1967)
- YANKELOWITZ, S.: Pharmacological Evaluation of
Aceclidine. Pharmacology Lab.
RAPPORT-SMITZ, MILLER and PATCH,
Inc. N. J. Cited by LIEBERMANN
and LEOPOLD (1967)
- YOUNG, R.W. und
OCUMPAUGH, D.E.: Autoradiographic Studies on the
Growth and Development of the
Lens Capsule in the Rat. Invest.
Ophthalmol. Bd. 5, S. 583 - 593,
(1966).

LEBENS LAUF

Am 12.10.1951 wurde ich als Sohn des Bäckermeisters Ernst MUNKERT und seiner Ehefrau Hermine, geb. KIRCHHOFF, in Nürnberg geboren. Von 1957 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in der Wiesenstraße. 1959 verzog meine Familie nach Windsbach und kehrte 1961 wieder nach Nürnberg zurück. 1963 wechselte ich ins Gymnasium und legte nach neunjähriger Schulzeit 1972 das Abitur im Neuen Gymnasium Nürnberg ab.

Im Wintersemester 1972/73 konnte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen in den Fächern Physik/Mathematik immatrikulieren. Im Sommersemester 1973 erhielt ich einen Studienplatz im Fach Medizin. 1975 legte ich erfolgreich die ärztliche Vorprüfung ab, 1976 folgte der erste, 1978 der zweite Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Das praktische Jahr leistete ich im Fach Kinderheilkunde an der Universitäts-Kinderklinik Erlangen ab, die Fächer Innere Medizin und Chirurgie im Städtischen Klinikum zu Nürnberg. Im Frühjahr 1979 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen für Medizin.

Am 8. Mai 1979 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Walter Munkert

THE
[Faint, illegible text follows, appearing to be a list or index of names and titles, possibly related to a historical or literary work.]

John Smith

